



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus* APLICADO EN PERFUMERÍA”

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: YESENIA MARISOL VILLACRÉS DELGADO

TUTOR: DRA. ELIZABETH ESCUDERO V., Mg

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, YESENIA MARISOL VILLACRÉS DELGADO

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus* aplicado en perfumería” de responsabilidad de la señorita Yesenia Marisol Villacrés Delgado, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Elizabeth Escudero Vilema, Mg

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Diego Vinuesa Tapia, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Yesenia Marisol Villacrés Delgado, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 12 de marzo de 2018

YESENIA MARISOL VILLACRÉS DELGADO

060350748-4

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres quienes han sido el pilar fundamental en todo momento para poder culminar este sueño tan anhelado, a mis hermanos y familiares por su apoyo moral en buenos y malos momentos, a mi novio quien de una u otra manera siempre ha estado apoyándome.

Especialmente dedico este logro a mi hijo quien ha sido la motivación más grande para alcanzar un objetivo más en mi vida.

Yesenia

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a mi Dios quien me ha dado la fuerza, salud y vida para poder cumplir cada objetivo planteado en mi vida.

A mis padres quienes han sido el pilar fundamental para cada decisión de mi vida, les doy las gracias también por haberme dado la oportunidad de tener una buena educación.

A mis hermanos, y demás familiares que de una u otra manera siempre han estado apoyándome cuando más los he necesitado.

A mi novio por brindarme su apoyo incondicional en cada decisión de mi vida, por su cariño y constancia para lograr juntos este logro.

Agradezco de todo corazón al apoyo brindado por parte de la Dra. Elizabeth Escudero quien ha sido una guía muy importante en la realización de este trabajo tanto en el ámbito académico como en su don de gente.

A BQF. Diego Vinueza quien con su experiencia y manera de ser estuvo siempre apoyándome en la realización de este trabajo.

Agradezco la colaboración de la Universidad Técnica de Ambato y al Proyecto Canje de Deuda - Ecuador- España por permitirme el uso del Cromatógrafo de gases - espectrometría de masas.

A todos los docentes en general quienes han sido una influencia positiva para culminar esta etapa de mi vida.

A todos bendiciones y muchas gracias...

Yesenia

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RT: tiempo de retención

% CR: porcentaje de concentración relativa

T1: control negativo, Agua destilada por 48 horas

T2: control positivo, EtOH absoluto por 48 horas.

T3: Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (0,2%) por 48 horas.

T4: Aceite esencial de *Cymbopogon* cf. *martini* (0,2%) por 48 horas

T5: Aceite esencial de *Cymbopogon* cf. *nardus* (0,2%) por 48 horas.

T6: Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (0,4%) por 48 horas.

T7: Aceite esencial de *Cymbopogon* cf. *martini* (0,4%) por 48 horas.

T8: Aceite esencial de *Cymbopogon* cf. *nardus* (0,4%) por 48 horas

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO	6
1.1	Plantas Aromáticas Medicinales	6
1.2	<i>Cymbopogon citratus</i>	6
1.2.1	<i>Taxonomía</i>	7
1.2.2	<i>Origen y Distribución</i>	8
1.2.3	<i>Descripción Botánica</i>	8
1.3	<i>Cymbopogon nardus</i>	9
1.3.1	<i>Taxonomía</i>	10
1.3.2	<i>Origen y Distribución</i>	10
1.3.3	<i>Descripción Botánica</i>	10
1.4	<i>Cymbopogon martini</i>	11
1.4.1	<i>Taxonomía</i>	12
1.4.2	<i>Origen y Distribución</i>	12
1.4.3	<i>Descripción Botánica</i>	12
1.5	Aceites esenciales.....	13
1.5.1	<i>Partes de la planta donde se encuentra</i>	13
1.5.2	<i>Clasificación de los aceites esenciales</i>	13
1.5.3	<i>Propiedades</i>	15
1.5.4	<i>Características físicas</i>	15
1.5.5	<i>Composición química</i>	15
1.5.6	<i>Obtención</i>	16
1.5.7	<i>Usos de los aceites esenciales</i>	17
1.6	Genotoxicidad	18
1.6.1	<i>Genotoxinas</i>	18

1.6.2	<i>Agente genotóxico</i>	18
1.6.3	<i>Mutágeno</i>	19
1.6.4	<i>Ensayos genotóxicos</i>	20
1.7	<i>Micronúcleos (MN)</i>	20
1.7.1	<i>Formación de micronúcleos</i>	21
1.8	<i>Ensayo de micronúcleos</i>	22
1.9	<i>Perfumería</i>	23
1.9.1	<i>Definición de perfume</i>	23
1.9.2	<i>Materias primas de la perfumería</i>	23
1.9.3	<i>Estructura de los perfumes</i>	25
1.9.4	<i>Composición del perfume</i>	27
1.9.5	<i>Tipos de fragancias</i>	28

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	30
2.1	Adquisición del permiso de investigación para trabajar con los especímenes vegetales	30
2.2	Recolección del material vegetal	30
2.3	Identificación botánica	30
2.4	Lugar de investigación	31
2.5	Materiales, equipos y reactivos	31
2.5.1	<i>Materiales</i>	31
2.5.2	<i>Equipos</i>	33
2.5.3	<i>Reactivos</i>	33
2.6	Procesamiento de la muestra	34
2.6.1	<i>Secado y molienda</i>	34
2.7	Control de calidad del material vegetal	35
2.7.1	<i>Determinación de humedad</i>	35
2.7.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	35
2.7.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	36
2.7.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	37
2.8	Tamizaje fitoquímico	39
2.8.1	<i>Obtención de los extractos etéreo, etanólico y acuoso</i>	39
2.8.2	<i>Ensayos del tamizaje fitoquímicos</i>	39

2.9	Extracción de los aceites esenciales.....	43
2.10	Control de calidad de los aceites esenciales	44
2.10.1	<i>Medición de la densidad de los Aceites Esenciales</i>	44
2.10.2	<i>Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales</i>	44
2.11	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas de los aceites esenciales para la determinación de la composición química	45
2.12	Estudio de Genotoxicidad de los aceites esenciales	45
2.12.1	<i>Ensayo de Micronúcleos</i>	45
2.13	Elaboración de perfumes.....	47
2.13.1	<i>Proceso de elaboración de los perfumes.....</i>	48

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
3.1	Control de calidad de la materia prima	49
3.2	Tamizaje fitoquímico	50
3.3	Extracción de los aceites esenciales.....	52
3.3.1	<i>Rendimiento de los aceites esenciales.....</i>	52
3.4	Control de calidad de los aceites esenciales	53
3.4.1	<i>Medición de la densidad de los aceites esenciales.....</i>	53
3.4.2	<i>Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales</i>	54
3.5	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas de los aceites esenciales para la determinación de la composición química	54
3.6	Estudio de Genotoxicidad de los aceites esenciales	61
3.6.1	<i>Ensayo de Micronúcleos</i>	61
3.7	Elaboración de perfumes.....	64
	CONCLUSIONES.....	66
	RECOMENDACIONES.....	67

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Materiales usados en las diferentes pruebas	31
Tabla 2-2: Equipos utilizados en los diferentes ensayos.....	33
Tabla 3-2: Reactivos utilizados en los diferentes ensayos	33
Tabla 4-2: Diseño experimental según los tratamientos establecidos.....	47
Tabla 4-2: Componentes de la formulación de los perfumes.....	47
Tabla 1-3: Control de calidad de las hojas y tallos de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	49
Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	50
Tabla 3-3: Rendimiento de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	52
Tabla 4-3: Densidad de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	53
Tabla 5-3: Índice de refracción de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	54
Tabla 6-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	54
Tabla 7-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i>	56
Tabla 8-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	58
Tabla 9-3: Comparación de los compuestos identificados en los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i> y <i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	60
Tabla 10-3: Porcentajes de los índices de división celular e índice de micronúcleos.....	61
Tabla 11-3: Modelo Lineal General Univariado de los diferentes tratamientos aplicados en el estudio de genotoxicidad.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1: <i>Cymbopogon nardus</i>	9
Figura 3-1: <i>Cymbopogon martini</i>	11
Figura 4-1: Grupos funcionales de los componentes de los aceites esenciales.....	16
Figura 5-1: Proceso de genotoxicidad	19
Figura 6-1: Formación de Micronúcleos en el curso de la división celular.	22
Figura 7-1: a) MN en medula ósea de ratón, b) MN en eritrocito de aves, c) MN en queratinocitos de ambystoma d) MN en mucosa bucal humana	22
Figura 8-1: Materiales naturales para perfumería	24
Figura 9-1: Materiales sintéticos para perfumería	25
Figura 10-1: Esquema de los tipos de aceites esenciales y sus	27
Gráfico 1-3: Perfil cromatográfico de <i>C. citratus</i>	55
Gráfico 2-3: Perfil cromatográfico de <i>C. cf. martini</i>	57
Gráfico 3-3: Perfil cromatográfico de <i>C. cf. nardus</i>	59
Gráfico 4-3: Efecto de los tratamientos sobre las células en las diferentes fases de mitosis.	64

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL MATERIAL VEGETAL (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO B: SEPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO C: CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO D: TAMIZAJE FITOQUÍMICO (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO E: CROMATÓGRAFO DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

ANEXO F: PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR GC-MS DE LAS TRES MUESTRAS EN ESTUDIO (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO G: ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD – ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

ANEXO H: CÉLULAS DE *Allium cepa* EXPUESTAS A LOS TRATAMIENTOS CON LOS ACEITES ESENCIALES DE *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus* DURANTE 48 HORAS MOSTRANDOSE CON NORMALIDAD SIN PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS.

ANEXO I: EFECTOS PRODUCIDOS EN CÉLULAS DE *Allium cepa* POR EXPOSICIÓN A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

ANEXO J: CONTROL POSITIVO DEL ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD

ANEXO K: DISEÑO ESTADÍSTICO 2^K APLICADO PARA LA ELABORACIÓN DE LOS PERFUMES.

ANEXO L: ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE LOS PERFUMES A BASE DE ACEITES ESENCIALES (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*).

ANEXO M: AUTORIZACIÓN DEL PERMISO DE INVESTIGACIÓN EMITIDO POR EL MINISTERIO DE AMBIENTE- PASTAZA- ECUADOR.

ANEXO N: IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar la composición química de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini*, *Cymbopogon cf. nardus*, para lo cual se obtuvo los aceites esenciales mediante el método de arrastre de vapor y se realizó el control de calidad respectivo; se llevaron a cabo las diversas pruebas del tamizaje fitoquímico para conocer los metabolitos secundarios presentes en cada una de las plantas. La identificación de la composición química de los aceites esenciales se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Se estudió la potencial genotoxicidad de los tres aceites esenciales por medio del ensayo de micronúcleos aplicando como control negativo agua destilada, control positivo EtOH absoluto y seis tratamientos usando los aceites esenciales a dos concentraciones (0,2% y 0,4%) en raíces de *Allium cepa*. Se formularon 7 fragancias de perfumes en base a los tres aceites esenciales. Se determinó la diferencia en la composición química de los aceites identificando que sus componentes mayoritarios comunes son α -citral, con un porcentaje de 43,13%, seguido por β -citral, con un porcentaje de 21,73%, y Geraniol con 18,91%. Se concluye que la exposición de los meristemas de las raíces de *Allium cepa* sometidos a los tratamientos de los aceites esenciales no presentan genotoxicidad, pero presentan otro tipo de anomalías en las células. Para el análisis estadístico se utilizó el Modelo Lineal General Univariado dando como resultado una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados a los meristemas de las raíces de *Allium cepa*; de las 7 formulaciones de perfumes las más destacadas fueron la formulación 2 y 5 por su composición y beneficios. Se recomienda en el estudio de genotoxicidad realizar más diluciones de concentración de los aceites esenciales para corroborar la inexistencia de micronúcleos.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <PRODUCTOS NATURALES> <HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*)>, <GENOTOXICIDAD>, <CROMATOGRAFÍA DE GASES>, <MICRONÚCLEOS>, <ACEITE ESENCIAL>

ABSTRACT

The objective of this study was comparing the chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus*, for this purpose the essential were obtained through the steam trapping method with the corresponding quality control; various phytochemical screening tests were carried out in order to discover the secondary metabolites present in each of the plants. The identification of the chemical composition of the essential oils was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry. A genotoxicity study of the three essential oils was performed through a micronucleus test, applying distilled water as a negative control, absolute EtOH positive control and six treatments using the three essential oils at different concentrations (0,2% and 0,4%) in roots of *Allium cepa* (onion); 7 perfume fragrances were formulated based on the three essential oils. The difference in the chemical composition of the oils was determined by identifying that their common major components are α -citral, with a percentage of 43, 13% followed by β -citral, with a percentage of 21, 73%, and Geraniol with 18, 91%. It is concluded that the exposure of the meristems of the *Allium cepa* roots subjected to the different treatments of the essential oils does not present genotoxicity but it presents another type of anomalies in the cells. For the statistical analysis the Univariate General Linear Model was used, resulting in the existence of a significant difference between the treatments applied to the meristems of the roots of the *Allium cepa*; out of the 7 perfume formulations the most outstanding were the formulation 2 and 5 due to its composition and benefits. It is recommended in the genotoxicity study to make more concentration dilutions of the essential oils to corroborate the non-existence of micronuclei.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <NATURAL PRODUCTS> <LEMON GRASS HERB (*Cymbopogon citratus*)>, <GENOTOXICITY>, <GAS CHROMATOGRAPHY>, <MICRONUCLEI>, <ESSENTIAL OIL>

INTRODUCCIÓN

En la actualidad en el Ecuador la población no tiene conocimiento en relación al género *Cymbopogon*, ya que, él mismo fue introducido en nuestro país hace ya varios años atrás. La única especie reconocida taxonómicamente de este género es *Cymbopogon citratus* más conocida comúnmente como “Hierba Luisa”, pero hoy en día existen variedades similares que aparentemente muestran ser dos especies diferentes de *C. citratus*, por esta razón la mayoría de la gente tiende a confundir estas tres plantas, puesto que en el país no existen estudios comparativos en cuanto a la composición química, de los diferentes tipos del género antes mencionado (Solano A &Correa V 2013).

Los aceites esenciales de las especies del género *Cymbopogon* pueden ser utilizadas en diferentes formas cosméticas específicamente en la perfumería ya que contienen citronelol, citral, eugenol, nerol, geraniol y limoneno en altas proporciones que son los componentes que le brindan su aroma característico muy agradable, por esta razón se realizará la investigación mediante la cual se podrá conocer la diferencia en la composición química de las especies y en base a ella la formulación de un perfume (Pozo 2006).

La calidad de la materia prima influye de manera directa en el producto final, dado que, los fabricantes de cosméticos buscan obtener un producto que no sea perjudicial para el consumidor. éstas sustancias aplicadas sobre la piel pueden causar graves efectos dañinos, entre los más frecuentes están la irritación y la sensibilización alérgica, pero también se pueden presentar urticaria de contacto como resultado de la liberación de histamina, picor, fototoxicidad y fotoalergia (Silva 2016).

En la actualidad, a nivel nacional e internacional las plantas medicinales forman parte indispensable en los sistemas de salud de los países en desarrollo, descrito así por la Organización Mundial de la Salud la cual menciona que el 80% de las personas a nivel mundial utiliza rutinariamente medicina tradicional para atender sus problemas de salud, y gran parte de estos tratamientos implican el uso de los extractos de las plantas medicinales o sus principios activos (ALEXIS BERMÚDEZ, MARÍA A. OLIVEIRA-MIRANDA 2005).

Nuestro país se caracteriza por su alta biodiversidad biológica lo que lo ha llevado a ser uno de los países con un enorme potencial referido a la medicina tradicional (Zambrano-Intriago et al. 2015). Actualmente los principios activos utilizados a nivel cosmético pueden ser obtenidos mediante la materia más económica como lo son las plantas medicinales, dentro de estos principios activos podemos mencionar a los aceites esenciales presentes en diversas especies vegetales en este caso “Hierba Luisa” (Género *Cymbopogon*) (Saldaña Medina y Torres Vintimilla 2012).

El mundo de la cosmética mueve mucho dinero siendo unos de los principales consumidores la población joven, por ello es que se pone de manifiesto el interés de los publicistas y de las propias campañas de publicidad en llamar la atención a este grupo de la población, a quienes van dirigidas muchas de ellas, aunque en general toda la población muestra un gran interés en el uso de los cosméticos (Giménez et al. 2011).

El género *Cymbopogon* incluye cerca de 140 especies (Poaceae et al. 2005). Muchas de estas especies, así como sus esencias son utilizadas como condimentos de alimentos, en perfumería, en la fabricación de jabones y en la obtención de productos farmacéuticos (Quintanilla et al. 2012).

Por sus propiedades organolépticas y su rendimiento a nivel cuantitativo de aceites esenciales el género *Cymbopogon*, es un potencial candidato para su explotación a nivel cosmético y en forma especial a nivel de perfumería. Los aceites esenciales más utilizados en esta línea cosmética son los obtenidos a partir de *C. martini*, *C. citratus* y *C. nardus*, los cuales presentan olor fresco, agradable parecido al limón de tipo floral (Frochoso 2004).

Diariamente el uso de plantas medicinales en Ecuador va en aumento, por ello se ha estudiado varias de estas plantas medicinales como se describe en una investigación en la que determinan el potencial industrial del aceite esencial de muchas plantas como *Mentha piperita* L, *Bursera graveolens* y *Cymbopogon citratus*, en la provincia de Manabí (Molina 2013).

En general, dentro del género *Cymbopogon* se ha estudiado la especie *C. citratus*, la cual ha sido utilizada en investigaciones como las descritas por J. Saldaña et al 2012, las mismas que señalan la

actividad antiinflamatoria del aceite esencial de esta planta, utilizados en conos nasales para aliviar dolores e inflamación en esta parte del sistema respiratorio, logrando obtener como resultado que estas formas farmacéuticas cumplen su objetivo (Saldaña Medina y Torres Vintimilla 2012).

Toda la información bibliográfica recopilada indica que en el Ecuador no se da otro uso más que el farmacológico al aceite esencial de *C. citratus* (Loachamin Suntaxi & Loayza Valarezo 2016).

En México se describe el análisis de la actividad repelente del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* frente a diversos géneros de mosquitos, como lo señala el autor en sus resultados (Moctezuma Maciel et al. 2014).

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de comparar la composición química de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*; analizados mediante cromatografía de gases acoplada a masas, ya que a través de este análisis y en conjunto con el control de calidad y el análisis fitoquímico de las tres plantas se podría confirmar que se trata de especies diferentes de *C. citratus*, tomando como base para esto la quimiotaxonomía.

A partir de lo anterior, se puede realizar la formulación de varios perfumes mediante la combinación de los aceites esenciales en diferentes proporciones aprovechando su agradable aroma. Además, se puede realizar el análisis de genotoxicidad de los aceites esenciales, ya que por el hecho de que se formulan perfumes a partir de éstos, es importante conocer que dichos aceites no sean perjudiciales para las personas.

Cabe mencionar que la importancia de esta investigación no solo radica en la aportación de conocimiento científico, sino que también impulsa el uso de las plantas medicinales de una manera productiva para el desarrollo del país, contribuyendo a los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir y plan Toda una Vida del Gobierno Nacional.

Esta investigación tienen como finalidad confirmar a través del análisis de la composición química de los aceites esenciales la posible existencia de diferentes especies del genero *Cymbopogon* en el país, además de aquello brindar una alternativa para la elaboración de fitocosméticos que sean realmente seguros para la población.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar la composición química de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtener el aceite esencial de las hojas y tallos del material vegetal mediante el método de arrastre de vapor.
- Caracterizar químicamente los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- Realizar el ensayo de genotoxicidad de los aceites esenciales mediante la prueba de micronúcleos.
- Elaborar 7 formulaciones de perfumes a partir de los aceites esenciales obtenidos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Plantas Aromáticas Medicinales

En la actualidad se muestra mucho más interés respecto al estudio de las plantas medicinales de forma etnobotánica, en fitoterapia y fitoquímica (Beyra et al. 2004). Ecuador es una de los países más reconocidos por su variedad en flora, la misma que se puede llegar a industrializar obteniendo buenos resultados; siendo una de las varias estrategias para el desarrollo del país (Solano A &Correa V 2013).

En el país, varias instituciones han mostrado interés por la elaboración de diversos productos naturales, dentro de estos productos tenemos por ejemplo, aceites esenciales, que tienen una gran demanda en el mercado nacional e internacional y gracias a ellos se puede dar un ingreso representativo tanto para los agricultores como para los productores (Pozo 2006).

Entre el grupo de plantas más destacadas por sus propiedades medicinales se encuentra la hierba luisa (*Cymbopogon*), que es importante por su gran contenido de aceite esencial, el mismo que tiene un alto contenido en citral, que exhibe sus propiedades antibacterianas y antimicrobianas (Pozo 2006, p 20).

1.2 *Cymbopogon citratus*

En Ecuador es conocida también como “hierba luisa”, comúnmente en la Amazonía se la denomina como patchuli falso, en Cuba es conocida vulgarmente como caña santa, cañita de limón, hierba de calentura, lemongrass. En Estados Unidos y las Antillas Inglesas se la denomina como lemongrass,

limoncillo, matojo de limón, y así tiene varios nombres en los diferentes países donde esta se encuentra situada (Pozo 2006).



Figura 1-1: *Cymbopogon citratus*
Fuente: (Pozo 2006)

1.2.1 Taxonomía

De estudios realizados anteriormente en base a esta planta se determina la siguiente clasificación

- **Reino:** Cormobionta.
- **División:** Magnoliophyta.
- **Clase:** Liliatae (Liliopsida).
- **Sub-clase:** Commelinidae.
- **Orden:** Cyperales.
- **Familia:** POACEAE (Gramíneas).
- **Género:** *Cymbopogon Spreng.*
- **Especie:** *citratus Stapf.*

Fuente: (Pozo 2006, p 22)

1.2.2 Origen y Distribución

La “hierba luisa” es originaria de la India, regiones de Asia Suroriental y África ecuatorial. Se encuentra distribuida en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Pozo 2006).

1.2.3 Descripción Botánica

La “hierba luisa” es una planta herbácea, muy vigorosa. Su tamaño es mediano, la altura máxima a la cual llega la planta es de 1.50 m hasta 2 m con un diámetro de 5 cm., y posee de 40 a 50 hijos (Pozo 2006).

1.2.3.1 Raíz

La hierba luisa posee una raíz corta, muy ramificada. Estudios antes realizados han determinado que la mayoría de las raíces se encuentran en el suelo a una profundidad de 0.30 cm (Pozo 2006).

1.2.3.2 Tallo

Posee una forma cilíndrica, es fuerte y corto. Su color es verde, cuando la planta es cortada, este se torna café rojizo (Pozo 2006).

1.2.3.3 Hojas

Son de color verde oscuras, tienen una vaina tubular la cual recubre al tallo, encontrándose agrupadas cerca de la base. Tienen los bordes ásperos llenos de cerdas (parecidos al filo de un serrucho), que al ser manipulada la planta causan cortaduras. El largo de las hojas va de 60 cm. a 1m, y el ancho de (0.01 a 0.02) m, estas dimensiones varían con cada estación climática. Las hojas poseen un fuerte aroma a limón, ya que en el lado central del mesófilo y entre los haces vasculares

se encuentran las células donde se almacena el aceite esencial, el mismo que es rico en citral. Las células epidérmicas de las hojas poseen sílice, el cual puede causar úlceras (Pozo 2006).

1.2.3.4 Flor

Esta planta por lo general no florece, cuando lo hace es porque ha crecido en un clima propicio y no ha sido cortada en varios años. Las flores se encuentran sostenidas en el tallo, en varios racimos (Pozo 2006).

1.3 *Cymbopogon nardus*

Esta planta perteneciente al género *Cymbopogon* es conocida en el Ecuador como “Citronella”, además en otros países se la conoce como Citronela falsa (Zaire), hierba de citronella (Taiwán), hierba de citronela azul (Kenia), hierba de hierba (India). Son árboles y arbustos, las ramas de vez en cuando escandentes. Hojas coriáceas o sub-membranosa, enteras, las venas oblicuas arqueadas y con anastomosis. Las inflorescencias terminales, axilares, extra-axilares o supra-axilares, paniculadas. Flores perfectas o polígamas; pétalos libres, carnosos, los ápices inflexos, la nervadura central prominente desarrollada; carnosas, cáliz persistente disco; estambres libres, los filamentos carnosos. Drupas carnosas (Moctezuma Maciel et al. 2014, p 3).



Figura 2-1: *Cymbopogon nardus*

Fuente: («Fotos de Té limón (*Cymbopogon nardus*) • NaturaLista» [sin fecha])

1.3.1 *Taxonomía*

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Liliopsida
- **Subclase:** Commelinidae
- **Orden:** Poales
- **Familia:** Poaceae
- **Subfamilia:** Panicoideae
- **Tribu:** Andropogoneae
- **Género:** *Cymbopogon*
- **Especie:** *Cymbopogon nardus*

Fuente: (Naturalista 2014, p 1)

1.3.2 *Origen y Distribución*

Esta planta se encuentra en África tropical del oeste, tropical del oeste-central, tropical del noreste, tropical del este, tropical meridional, sur y oeste del Océano Índico, Asia-templado: China y Asia oriental, Asia-tropical: India, Indo-China y Malasia. Pacífico: suroeste y noroeste. América del Sur: Caribe y Norte de América del Sur (Moctezuma Maciel et al. 2014).

1.3.3 *Descripción Botánica*

Es de hábito perenne, vainas persistentes y la inversión de base de culmos es de 75-300 cm de largo. Apéndice de una membrana eciliada; 3-9 mm de largo, con hojas caídas; plano; 20-60 cm de largo; 3-15 mm de ancho; aromático, la superficie de la hoja es lisa (Moctezuma Maciel et al. 2014).

Posee además dos racimos emparejados que van de 1-2 cm de largo, raquis frágil en los nodos, ciliados en los márgenes, raquis pelos de 0.5-3 mm de largo, internudos lineales, cupuliforme en racimo con bases aplanadas (Moctezuma Maciel et al. 2014).

Espiguillas fértiles que comprenden 1 flósculo estériles basales, 1 floretes fértiles sin extensión de la rachilla, espiguillas lanceoladas con compresión dorsal de 3,5 -7 mm de largo, posee además cayendo entero, callo piloso de espiguilla base obtusa insertado (Moctezuma Maciel et al. 2014).

Glumas disímiles superior al ápice de los flósculos, pero más firme que el lema fértil, gluma inferior lineal con 1 longitud de espiguilla, chartaceous de 2 carriles que se encuentra cargado todo el tiempo alado en la quilla con alas por encima. Venas intercarinales inferiores de la gluma ausente u oscura que van de 0-4 en número. Superficie inferior de la gluma convexa, plana o cóncava. El ápice inferior de la gluma emargina, la gluma superior es lanceolado (Moctezuma Maciel et al. 2014).

Floretes estériles basales, sin palea significativa, cuanta con una lemma del flósculo estéril inferior hialino, la lemma fértil es lanceolada, hialino y sin quilla (Moctezuma Maciel et al. 2014).

1.4 *Cymbopogon martini*

Conocida en América del sur como “Palmarosa”, en la amazonia ecuatoriana, los nativos la conocen como “Rusha”, por su olor característico a su aroma se lo denomina también olor a hierba de jengibre. Es una especie de planta herbácea del género *Cymbopogon* perteneciente a la familia de las gramíneas o poáceas. El aceite de palmarosa, que tiene un olor similar a las rosas, se añade a los jabones y cosméticos (Burbano 2016).



Figura 3-1: *Cymbopogon martini*

Fuente: (Kiran GD Babu 2004)

1.4.1 *Taxonomía*

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Liliopsida
- **Subclase:** Commelinidae
- **Orden:** Poales
- **Familia:** Poaceae
- **Subfamilia:** Panicoideae
- **Tribu:** Andropogoneae
- **Género:** *Cymbopogon*
- **Especie:** *Cymbopogon martinii*

Fuente: (Anon 2014, p 2)

1.4.2 *Origen y Distribución*

Es una hierba perenne nativa del sur y el sudeste de Asia, especialmente India.

La “Palmarosa” es una planta resistente y puede crecer en altitudes diferentes desde el nivel del mar. Se mantiene bien en lugares que reciben lluvias de 75 cm a 150 cm³. Pero no puede vivir en ambientes o superficies con agua estancada. Requiere la luz solar expuesta y no funciona bien bajo situaciones sombrías. La “Palmarosa” prefiere los suelos bien drenados de reacción neutra a alcalina y se puede cultivar en suelos pobres de arenosos a fértiles pesados de tierras áridas, condiciones salinas del suelo y también tierras marginales y sub marginales (Burbano 2016).

1.4.3 *Descripción Botánica*

Sus hojas van de 2 a 3 metros de altura, sus hojas son de forma lanceolada, de 50 cm de longitud y 1 a 3 cm de ancho, sus panículas varían entre 10 a 30 cm de longitud de un tono rojizo a menudo muy brillantes cuando están maduras. Su racimo se encuentra en forma de espiguillas distribuidas en pares de entre 15 y 19 mm de longitud, uno de estos pares esta en forma de pedicelo y se caracteriza por ser hermafrodita, y el otro se caracteriza por ser masculino. La forma de su secilio está

igualmente en espigas de 3.5 mm de longitud. Las vainas tienen un diámetro de entre 3.3 a 4 mm, las aristas de las hojas se encuentran a una medida de entre 11.4 y 14 mm (Lodhia et al. 2009).

1.5 Aceites esenciales

Un aceite esencial es un líquido aromático de aspecto fluido o espeso y con un color variable según las plantas del que se extrae. Es producido por células especiales que se encuentran tanto en las hojas, las flores, la madera (cedro del Atlas, sándalo blanco), las raíces (jengibre, valeriana, vetiver) o las semillas (cilantro, anís verde, zanahoria) (Luengo 2004).

Los aceites esenciales son también llamados esencias vegetales, por ser productos naturales del metabolismo secundario de las plantas (Pozo 2006).

1.5.1 Partes de la planta donde se encuentra

Por lo general se encuentran en forma de pequeñas gotas en el interior de las glándulas secretoras de tejidos presentes en raíces, hojas, flores, semillas y frutos. Estos se forman en las partes verdes de la planta, y cuando la planta está en la etapa de crecimiento estos pasan a las flores, semillas y frutos (Pozo 2006).

1.5.2 Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se los puede clasificar según varios criterios: consistencia, origen y naturaleza química de sus componentes mayoritarios (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

1.5.2.1 Consistencia

Por su consistencia los aceites pueden ser clasificados en:

- Esencias: son líquidos volátiles si se encuentran a temperatura ambiente.
- Bálsamos: son extractos obtenidos de arbustos o de árboles, su mayor característica es poseer en alta cantidad ácido benzoico y cinámico incluyendo sus ésteres (Cameroni 2012).
- Resinas: dentro de esta clasificación se puede encontrar combinaciones o mezclas entre resinas y aceites esenciales (Oleoresinas), gomas y resinas (Gomoresinas) (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

1.5.2.2 Origen

Dependiendo de su origen los aceites esenciales se clasifican en:

- Naturales: son aquellos que se obtienen directamente de la planta sin sufrir modificaciones ni físicas ni químicas (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).
- Artificiales: son obtenidos por procesos de enriquecimiento de la esencia con uno o más de sus componentes (Cameroni 2012).
- Sintéticos: son producidos por la combinación de sus componentes por procesos de síntesis químicas (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

1.5.2.3 Naturaleza química

Son de naturaleza química ya que el contenido total en aceites esenciales que una planta posee es generalmente bajo es decir inferior al 1% pero al obtenerlos por medio de extracción su concentración es mayor y son usados con varios fines industriales (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

1.5.3 *Propiedades*

Después de varios estudios realizados se conoce que los aceites esenciales cuentan con actividad antibacteriana, antimicótica, antiespasmódica, antiparasitaria, expectorante, antiviral, insecticida, favorecen la digestión, alivian los dolores musculares, relajante, antidepresiva, afrodisíaca, entre otras. Aunque no se han investigado aún muchas más propiedades que ellos poseen, debido a que están formados por una gran cantidad de sustancias químicas. Sin duda alguna, la más estudiada es su actividad antibacteriana (Pozo 2006).

1.5.4 *Características físicas*

Los aceites esenciales muestran las siguientes características físicas:

- Líquidos fluidos (temperatura ambiente)
- No son grasos
- Son volátiles.
- El color y olor de estos depende de la planta de la cual se lo extrae.
- Densidad inferior a la del agua.
- Índices de refracción son mayores que el del agua.
- La mayoría son insolubles en agua, pero se disuelven con facilidad en alcohol, éter y entre ellos mismos (Pozo 2006).

1.5.5 *Composición química*

Los aceites esenciales pueden estar constituidos por una composición fitoquímica simple o compuesta. Siendo los grupos funcionales que se describen a continuación (Universidad Politécnica de Madrid. 1998):



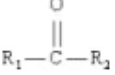
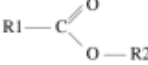
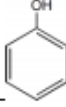
Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol		Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído		Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona		Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster		Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	-C - O - C -	Cineol, ascaridol	Expectorante, estimulante
Éter fenólico	Anillo - O - C	Safrol, anetol, miristicina	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol		Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico
Hidrocarburo	Sólo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante descongestionante antivírico, antitumoral

Figura 4-1: Grupos funcionales de los componentes de los aceites esenciales.

Fuente: (Universidad Politécnica de Madrid. 1998)

1.5.6 Obtención

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos de varias formas, esto dependerá del órgano de la planta del cual se va a realizar la extracción, además se debe cuidar de que al momento de ser extraído el aceite conserve sus características organolépticas y sus propiedades. Los procesos de extracción pueden ser:

1.5.6.1 Destilación

La parte de la planta de la que se va a extraer el aceite se introduce en agua dentro del recipiente que se va a utilizar, el cual se calienta, seguido a esto los productos volátiles son arrastrados por una corriente de vapor de agua hacia el refrigerante, en el cual se condensan, separándose el aceite del

agua en una zona de destilación. Este método no es usado en aquellos aceites donde las altas temperaturas alteran sus características organolépticas (Pozo 2006).

1.5.6.2 *Expresión en frío*

Este método es usado para la extracción de aceites esenciales de frutos cítricos, ya que los mismos no soportan altas temperaturas de la destilación. Mediante una esponja mojada con etanol y alfileres, pinchar la cáscara de los frutos, poco a poco se ira adsorbiendo el aceite, finalmente se procede a la separación aceite-etanol por medio de destilación al vacío (Pozo 2006).

1.5.6.3 *Extracción con solvente*

En este proceso entra en contacto el aceite con el solvente que puede ser éter etílico, hexano, benceno, para luego eliminar el solvente a presión reducida y purificar el aceite con alcohol absoluto. Al ser volátiles se los debe almacenar en lugares frescos (a bajas temperaturas), oscuros ya que son muy sensibles a la luz y dentro de un frasco hermético, el mismo que debe ser de vidrio y de color ambir (Pozo 2006).

1.5.7 *Usos de los aceites esenciales*

Industria Alimentaria: son empleados para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más utilizados en esta industria son el Cilantro, Naranja y Menta. Son utilizados también para la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, exclusivamente refrescos. Respecto a esta utilidad podemos citar las esencias extraídas del naranjo, limón, menta e hinojo. Estas esencias también son utilizadas en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

Industria Farmacéutica: son usados en la elaboración de cremas dentales por ejemplo el aceite de menta e hinojo, también en analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto), ya que el eucaliptol es muy usado en odontología. Son utilizados en la elaboración de neutralizantes de sabor desagradable de varios medicamentos, en este caso se encuentra el aceite de naranja y menta (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

Industria Cosmética: dentro de esta industria los aceites esenciales son utilizados en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este caso se pueden mencionar los aceites de “geranio”, “lavanda”, “rosas” y “pachouli”, y entre ellos también se considera a las diferentes especies del género *Cymbopogon* (Universidad Politécnica de Madrid. 1998).

1.6 Genotoxicidad

La genotoxicidad es la capacidad relativa que tiene un agente para producir daño en el material genético, generando efectos biológicos adversos (García-Bores et al. 2017).

1.6.1 Genotoxinas

Son agentes físicos o compuestos químicos que dañan la molécula del ADN. Estas genotoxinas son importantes ya que ejercen su acción a concentraciones ligeramente bajas de las que se necesita para producir la muerte y las lesiones que estas provocan en el material genético pueden ser transformadas en cambios hereditarios (García-Bores et al. 2017).

1.6.2 Agente genotóxico

Se considera agente genotóxico a cualquier elemento capaz de causar daño en el ADN (Cameroni 2012).

1.6.3 Mutágeno

Es un agente genotóxico que es incita a la formación y aparición de mutaciones (García-Bores et al. 2017).

Los mutágenos pueden ser:

- Agentes físicos como: Rayos Ultravioletas (U.V), radionizantes (α , β y γ), rayos X
- Compuestos químicos: Agentes análogos de Bases, agentes modificadores de Bases (agentes desaminantes, agentes alquilantes, agentes hidroxilantes), agentes intercalantes, agentes que bloquean el apareamiento entre bases (García-Bores et al. 2017).

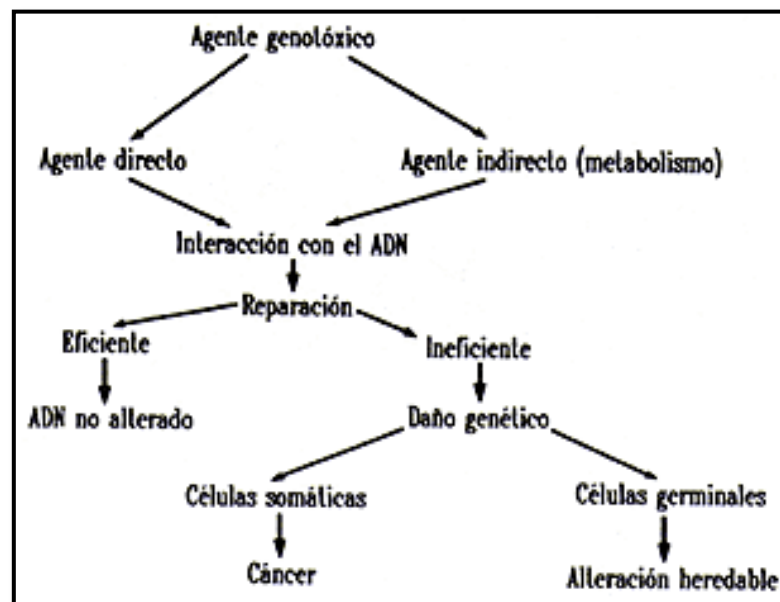


Figura 5-1: Proceso de genotoxicidad

Fuente: (García-Bores et al. 2017).

1.6.4 Ensayos genotóxicos

Los estudios de genotoxicidad están diseñados para localizar compuestos que inducen alteraciones genéticas de forma directa o indirecta mediante varios mecanismos en las células que están expuestas a los sustratos tóxicos. Los compuestos cuyo resultado es positivo durante los análisis para detectar estas alteraciones pueden provocar cáncer y anomalías hereditarias (Academia Europea de Pacientes 2015).

Los ensayos de genotoxicidad se pueden realizar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Dentro de los diferentes ensayos para determinar genotoxicidad se encuentran los siguientes:

- Daño directamente al ADN (Segmento I) / Daño en la estructura primaria del ADN.
- Mutaciones puntuales en células procariotas (Segmento II) / Daño a los genes.
- Estudio *in vitro* para detectar efectos cromosomales en células de mamíferos (Segmento III) / Daño a los cromosomas (Academia Europea de Pacientes 2015).
- Estudio *in vivo* para detectar efectos cromosomales en células hematopoyéticas y otras de roedores (Segmento IV) / Daño a los cromosomas (Academia Europea de Pacientes 2015).

1.7 Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos son masas de cromatina que tienen un aspecto parecido al núcleo principal ubicándose junto al mismo en el citoplasma de las células interfásicas (Academia Europea de Pacientes 2015). Son descritos como núcleos más pequeños, que se identifican fácilmente por microscopia de luz después de la obtención de la respectiva muestra, tras la preparación y tinción haciendo posible la evidencia del número de micronúcleos presentes en las células interfásicas (Zalacain et al. 2005).

En hematología los micronúcleos son denominados cuerpos de Howell-Jolly, por lo general su forma es redonda o almendrada y su diámetro esta alrededor de 0.4 a 1.6 micras (Bojorquez Morales 2010).

1.7.1 Formación de micronúcleos

Entre varios investigadores involucrados en el tema los más destacados son Countryman y Heddle en 1976 fueron los primeros que pusieron el ensayo de micronúcleos como una prueba alternativa y simple para diagnosticar el daño cromosómico causado en poblaciones de células en división. (Academia Europea de Pacientes 2015) Heddle (1973) y Schmid (1975) en Al-Sabti & Metcalfe (*op cit.*), expusieron que los micronúcleos son formados en el citoplasma a través de los siguientes eventos (Academia Europea de Pacientes 2015).

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas. Este proceso puede producirse equívocamente debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, roturas cromosómicas, efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas; lo que trae como consecuencia, pérdida cromosómica y que el reparto del material genético no sea equitativo. Las roturas cromosómicas darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómeros no serán incluidos en los núcleos hijos. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos que son visibles al microscopio óptico (Zalacain et al. 2005, p 19).

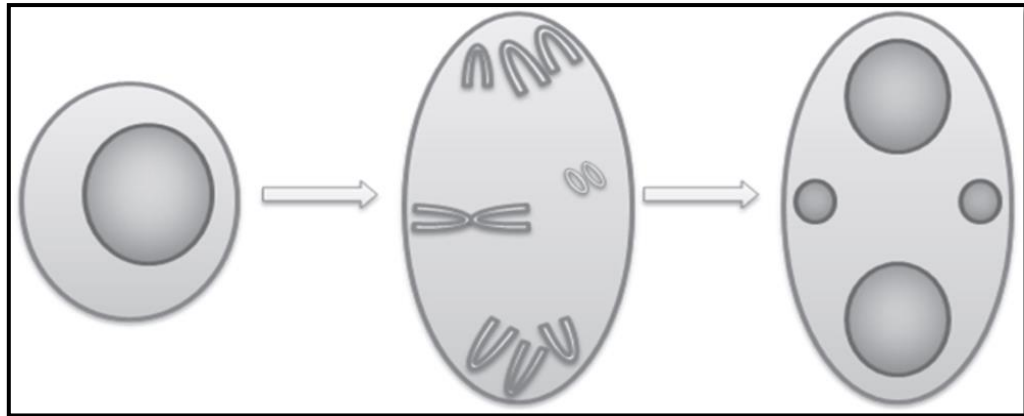


Figura 6-1: Formación de Micronúcleos en el curso de la división celular.

Fuente: (Academia Europea de Pacientes 2015).

1.8 Ensayo de micronúcleos

La prueba de micronúcleos es un método utilizado extensamente para detectar daño genotóxico el cual es producido por la acción de varias sustancias químicas y agentes físicos, este ensayo demuestra el daño mutagénico causado sobre los cromosomas a través de la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas subdesarrollados (Bojorquez Morales 2010).

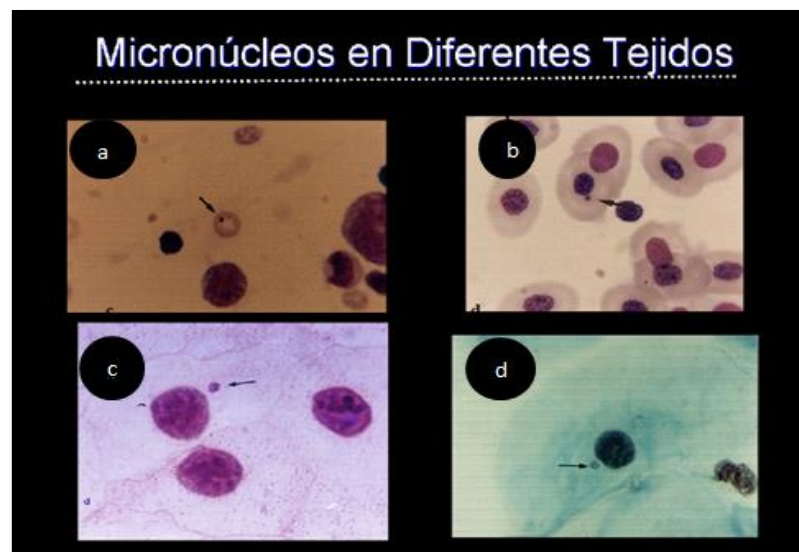


Figura 7-1: a) MN en medula ósea de ratón, b) MN en eritrocito de aves, c) MN en queratinocitos de ambystoma d) MN en mucosa bucal humana

Fuente: (Bojorquez Morales 2010).

1.9 Perfumería

1.9.1 Definición de perfume

La palabra perfume proviene del latín “*per*”, por y “*fumare*”, a través del humo, humo fragante que se desprende al ser quemada una sustancia aromática. En la actualidad, la palabra “*perfume*” se utiliza como una manera de nombrar internacionalmente cualquier olor cautivante que provenga de cualquier origen botánico o animal, se utiliza también para denominar el líquido aromático que usamos las personas para desprender olores agradables (Dom 2012).

La palabra perfume se atribuye en la actualidad, no sólo al aroma agradable de una esencia natural o artificial, formada por la mezcla de varios aromas más, sino también a los propios componentes perfumados de la mezcla (Frochoso 2004).

1.9.2 Materias primas de la perfumería

Las materias primas utilizadas en la perfumería están históricamente divididas, según su origen, en naturales y sintéticas. Aunque, en verdad, esta división no es realmente rotunda, entre las materias primas más comunes se mencionan las siguientes:

- Naturales

Se denominan así a aquellas materias primas que provienen de fuentes naturales por la aplicación de técnicas físicas de separación como por ejemplo la destilación o la extracción. Dentro de los productos naturales más utilizados durante décadas para la perfumería están: las flores, frutos, hojas, semillas, plantas enteras, raíces, maderas y resinas, que han sido y son y serán fuentes principales para la obtención de materiales aromáticos (Roldan 2004).

Se han utilizado también como fuente natural las glándulas odoríferas de ciertos animales, como el gato de algalia y el ciervo almizclero, para elaborar perfumes dirigidos a los seres humanos, desde los primeros momentos de la civilización (Frochoso 2004).

NATURALES	
Absoluto de hoja de violeta	Castóreo
Absoluto de Jazmin	Petigrén de Paraguay
Absoluto de mimosa	Pimienta
Absoluto de musgo de roble	Pimiento
Absoluto de nardo	Pipermín
Absoluto de rosa	Romero
Absoluto de tonca	Salvia
Absoluto de vainilla	Comino
Aceite de bálsamo de Perú	Coriandro
Aceite de estoraque	Corteza de canela
Aceite de gálbano	Costo
Aceite de jara	Estragón
Aceite de rosa	Extracto de Láudano
Albahaca	Extracto de olíbano
Algalia	Extracto de opopanax
Artemisa	Geranio bourbon

Figura 8-1: Materiales naturales para perfumería

Fuente: (Frochoso 2004).

- Sintéticas

Actualmente existen miles de productos químicos aromáticos fabricados de manera sintética como por ejemplo: la vainilla, los rosas óxido y las damasconas que pueden ser de utilizad para el perfumista. Otros, sin embargo, son netamente fruto de la imaginación de los químicos y nunca se han encontrado en la naturaleza. Para el perfumista no todos tienen el mismo valor y, por eso, el número de los que suelen utilizarse con frecuencia en la perfumería se acerca más al de los varios cientos que al de los varios miles (Roldan 2004).

Uno de los primeros materiales de la perfumería que pudo fabricarse de forma industrial fue el benzaldehído, preparado a partir del tolueno en 1866 (Frochoso 2004, p 28).

SINTÉTICOS	
Acetato de bencilo	Alcohol C11 undecilénico
Acetato de cedrilo	Alcohol C12 láurico
Acetato de cis-3hexenilo	Alcohol C12 MNA
Acetato de citronelilo	Aldehído C14
Acetato dimetil-bencil-carbinilo	Aldehído C16
Acetato de estiralilo	Citronelol
Acetato de feniletilo	Cumarina
Acetato de geranilo	Dihidromircenol
Acetato de greenilo	Dimetilacetal fenilacetalaldehído
Acetato de isobornilo	Etil-vainilla
Acetato de linalilo	Eugenol
Acetato de paracresilo	Evernyl
Acetato de vetiverilo	Fenilacetaldehído
Acetofenona	Fenilacetato de etilo
Ácido fenilacético	Fenilacetato de feniletilo
Alcohol cinámico	Feniletildimetilcarbinol
Alcohol fenilético	Formiato de geranilo

Figura 9-1: Materiales sintéticos para perfumería

Fuente: (Frochoso 2004)

1.9.3 Estructura de los perfumes

Un perfume está formado primordialmente por una mezcla de sustancias odoríferas comúnmente llamadas esencias y disolventes. Ningún perfume contiene menos de 20 a 30 elementos, pero algunos perfumes están elaborados con más de 100 esencias todas diferentes (Dom 2012).

Hay dos tipos de estructuras para la creación de perfumes: Por fases - notas de salida, medias y base o monolíticas, el aroma se mantiene sin variaciones mientras perdura este último tipo se empieza a crear a partir de 1980. Las fragancias monolíticas se caracterizan por estar creadas con pocos componentes al contrario de las de estructura por fases que son composiciones en las que fácilmente se alcanza a utilizar hasta un centenar de elementos (Dom 2012, p 7).

1.9.3.1 Fases - notas de salida

Al oler algún perfume las personas tienen la capacidad muchas veces de percibir varias de las esencias que lo conforman. A estos aromas identificados en el perfume se los conoce como NOTAS que no son nada más que los olores que se percibe cuando se aplica un perfume. Los materiales de la perfumería difieren mucho en su volatilidad, los hay desde los que tan sólo se mantienen durante unos minutos en el papel secante de la muestra hasta los que permanecen en ella durante varios días incluso semanas. Por esto, suele ser usual la división de los materiales en tres grupos en razón de su volatilidad (Giménez et al. 2011).

Los grupos de notas en las que se clasifican están las básicas o bajas que son las más persistentes; las notas medias, o modificadores, que tienen una volatilidad media; y las notas altas que son las más volátiles y efímeras (Giménez et al. 2011).

- **Notas de cabeza o altas:** Son aquellas que proporcionan un olor rápido al momento de aplicarnos el perfume que lógicamente corresponde a las sustancias más volátiles (Roldan 2004).
- **Notas medias y de cuerpo:** Estas notas son las que representan al perfume como tal, después de las primeras percepciones que originan las notas de cabeza aparecen las esencias que le dan particularidad a cada perfume (Giménez et al. 2011).
- **Notas bajas o notas básicas / de fondo:** estas notas están constituidas por aquellas sustancias que se volatilizan muy lentamente. Muchas de estas sustancias suelen ser algunos de los componentes fijadores del perfume como el almizcle y algunas resinas (Giménez et al. 2011).

La armonía entre los tres grupos dentro de la formulación es vital para la difusión del perfume durante la evaporación, e incluso para su calidad. La estructura del perfume se presenta en un diagrama triangular dividido en tres franjas horizontales que simbolizan las notas de fondo, las notas intermedias y las notas de cabeza y que ejemplifica la composición de un perfume perfecto (Dom 2012).

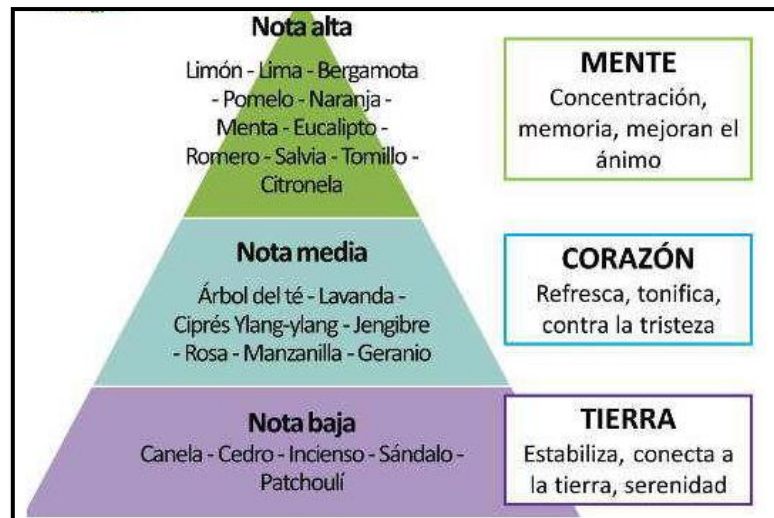


Figura 10-1: Esquema de los tipos de aceites esenciales y sus respectivas notas

1.9.4 *Composición del perfume*

Cualquier fragancia está constituida primordialmente por una sustancia aromática, un diluyente y un fijador de aroma, independientemente de estos tres componentes se puede adicionar también colorante, conservante y antioxidante, estos componentes son opcionales (Suskind 2011).

1.9.4.1 *Sustancias aromáticas*

Las sustancias aromáticas se pueden obtener de diferentes procedencias, es decir que puede ser un aceite esencial natural o una esencia sintética que a su vez puede ser la mezcla de varias sustancias. En si el aceite esencial es el ingrediente más importante dentro de la formulación ya que este es el que da el olor al perfume, según la cantidad que se utilice del aceite esencial se denominará al tipo de fragancia (Suskind 2011).

1.9.4.2 *Diluyentes*

El diluyente dentro de la composición de un perfume es el ingrediente mayoritario ya que este sirve como base para mezclar los demás ingredientes, los diluyentes más usados son el alcohol etílico y el agua. En la actualidad la elaboración de perfumes se realizan en forma de solución oleosa lo que

conllea a que el diluyente más usado sea el alcohol etílico ya que facilita la disolución del aceite a diferencia del agua (Giménez et al. 2011).

1.9.4.3 *Fijador de esencia*

Los fijadores de esencia son sustancias que se añaden a la formulación del perfume con la finalidad de que el aroma perdure por más tiempo una vez que sea roseado, es decir el aroma se volatilice más lento y sea más duradero, este ingredientes es usado en pequeña cantidad. Los fijadores pueden tener su propio aroma o pueden ser completamente inodoros, y pueden ser de origen sintético, vegetal u orgánico (Suskind 2011).

1.9.4.3.1 *Fijadores naturales*

Son sustancias de altos puntos de ebullición que oscilan entre los 285 a 290°C que se consiguen a través del aislamiento de flores y de varias otras partes de las plantas y de muchos animales, visto químicamente los fijadores naturales son aceites que tienen propiedades fijadores de aroma y además pueden brindar un agradable aroma. Dentro de los muchos de fijadores naturales tenemos el de salvia, pachuli, Onís y el de sándalo (Giménez et al. 2011).

1.9.4.3.2 *Fijadores sintéticos*

Son sustancias que se obtienen en el laboratorio y que por lo general suelen ser ésteres de alto punto de ebullición, algunos de ellos son inodoros como es el caso del diacetato de glicerillo y ftalato de etilo que presentan un punto de ebullición de 259°C, benzoato de bencilo (p.e. 323°C). Por otro lado también están aquellos que poseen su propio olor como pueden ser: benzoato de amilo, cetona de almizcle, ésteres de alcohol cinámico o indol, ésteres de ácido cinámico o vainillina, acetofenona.

1.9.5 *Tipos de fragancias*

Las fragancias se clasifican dependiendo de su intensidad aromática:

- **Perfume:** es la forma con más concentración de esencia aromática que va entre el 15 y el 40%; generalmente tienen hasta un 20% de ingredientes activos es decir de aceites esenciales, su duración va de 4 a 7 horas. Este tipo de fragancia es recomendable aplicarlo a través de un atomizador lo cual hace que el área de aplicación sea mucho más grande y no exista contaminación al tocar el perfume con los dedos ya que esto puede cambiar el olor original. Por todo esto este tipo de fragancia es la más cara del mercado (Ruta 1922).
- **Egua de perfume:** este tipo de concentración tiene una concentración del 15%, de los cuales el 10% son de aceites esenciales o fragantes y dura en el cuerpo de 3 a 5 horas después de su aplicación (Dom 2012).
- **Agua de baño:** es más conocida como Eau de Toilette, la cual tiene una concentración entre 7 y 15%, su duración es más o menos de 3 horas en el cuerpo (Dom 2012).
- **Agua de colonia:** conocida también como Eau de Cologne, posee la mismas concentración que agua de baño pero con la presencia de aromas cítricos, la concentración de esta fragancia va entre un 3 y 6%, la duración que tiene es de 2 horas en el cuerpo después de su aplicación, este tipo de fragancia es la más usada por los hombres ya que les encanta aplicar su perfume de manera generosa (Ruta 1922).
- **Perfume sólido:** Básicamente es el perfume tradicional, en el cual se usa ingredientes que se solidifican. Se aplica con los dedos y no es tan duradero como los perfumes tradicionales. Un ejemplo de esta forma de perfumes son las fragancias árabes, hechas con aceites esenciales y que se llevan usando por miles de años (Dom 2012).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Adquisición del permiso de investigación para trabajar con los especímenes vegetales

Para obtener el permiso de investigación se procedió a entregar los respectivos requisitos en el Ministerio de Ambiente de la provincia de Pastaza, lugar donde se guarda la evidencia tanto digital como física de los documentos entregados para proceder a emitir el permiso de movilización y de investigación correspondientes.

2.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini*, *Cymbopogon* cf. *nardus*) se recogió en la parroquia San Jorge perteneciente al cantón Santa Clara provincia de Pastaza, entre los 300 y 1100 msnm.

Punto de recolección:

- Latitud: -1.28333
- Longitud: -77.8833
- Altitud: 600 msnm

2.3 Identificación botánica

Las muestras del género *Cymbopogon*, fueron identificadas en el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en donde reposan sus muestras y colección.

2.4 Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se llevará cabo en los laboratorios de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.5 Materiales, equipos y reactivos

2.5.1 *Materiales*

Tabla 1-2: Materiales usados en las diferentes pruebas

MATERIAL	NÚMERO
CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL	
Cápsulas de porcelana	9
Pizeta	1
Reverbero	1
Pinzas para cápsulas	2
Crisoles de porcelana	9
Pipeta de 1 mL	1
EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	
Matraz pyrex (2 L)	1
Refrigerante	1
Codo “ T ”	1
Vaso de precipitación de 600 mL	2
SCREENING FITOQUÍMICO	
Tubos de ensayo	20
Gradilla	2
Pipeta de 5 mL	1
Pipeta de 1 mL	1
Pipeta de 10 mL	1
Reverbero	1

Vasos de precipitación de 250 mL	2
CROMATOGRAFÍA DE GASES - ESPECTROMETRÍA DE MASAS	
Micropipetas 100 µL	1
Puntas amarillas	9
Pocillos para cromatógrafo de gases	3
ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD – ENSAYO DE MICRONÚCLEOS	
Vasos desechables	8
Vasos de precipitación de 250 mL	1
Balones de aforo de 50 mL	6
Balón de aforo de 100 mL	3
Micropipeta de 50 µL	1
Micropipeta de 100 µL	1
Reverbero	1
Termómetro	1
Tubos de ensayo	8
Bisturí	1
Porta y cubre objetos	20
Capsula de porcelana	1
Pinza de disección	1
ELABORACIÓN DE PERFUMES	
Balón de aforo de 10 mL	7
Envases de perfume de 2 mL	7
Micropipeta de 20 µL	1
Micropipeta de 10 µL	1
Puntas amarillas y azules	20

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.5.2 Equipos

Tabla 2-2: Equipos utilizados en los diferentes ensayos

ANÁLISIS	EQUIPO
Control de calidad de la materia prima y Screening Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O, PHILA. PA, U.S.A
	Estufa Memmert, Estufa redLINE
	Mufla OPTIC ivymen system
	Desecador
	Balanza analítica HDM ELQUITECNICA CIA. LTDA
Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas	Cromatógrafo Agilent Technologies 7693 Autosampler, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5977 y equipado con un puerto de inyección split/splitless (250°C, relación split 1:30) y un inyector automático Agilent 7890.
Estudio de Genotoxicidad – Ensayo de Micronúcleos	Microscopio óptico
	Estufa Memmert, Estufa redLINE

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.5.3 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en los diferentes ensayos

ENSAYO	REACTIVO
SCREENING FITOQUÍMICO	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de Baljet
	Reactivo de Lieberman Buchard
	Reactivo para Catequinas

	Reactivo para resinas
	Reactivo de Fehling
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Borntrager
	Reactivo de Shinoda
	Reactivo de Antocianidinas
	Cloruro férrico
	Magnesio metálico
	Cloruro de sodio (polvo)
	Ácido clorhídrico
CROMATOGRAFÍA DE GASES - ESPECTROMETRÍA DE MASAS	Hexano (Grado MS)
	Helio (Grado S)
	Agua destilada
ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD – ENSAYO DE MICRONÚCLEOS	Solución de Farmer (ácido acético 1:3 y MeOH absoluto)
	HCl 1N
	EtOH 70%
	Ácido acético 45%
	Orceína Acética
	Agua destilada

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.6 Procesamiento de la muestra

2.6.1 *Secado y molienda*

Las plantas frescas (tallos y hojas) son secadas en una estufa de aire caliente a una temperatura de 45°C, protegida de la luz y libre de humedad, cuando el material vegetal llega a un 12% de humedad se procede a tritararlo un tamaño de partícula menor a 5 mm.

2.7 Control de calidad del material vegetal

2.7.1 *Determinación de humedad*

Este método gravimétrico que se realiza por desecación y para su determinación se parte de 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere este a una capsula previamente tarada, posterior a esto se persigue a secar en estufa por 3 horas a 105°C. Culminado este tiempo se coloca la capsula en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesa; nuevamente se coloca la capsula en la estufa por una hora más y se repite todo este proceso hasta que el peso sea constante (USP 2007) (UNAD 2011).

Este ensayo se realizó por triplicado y los cálculos del mismo se realizaron mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M2-M3}{M2-M1} \times 100$$

Dónde:

M1: Masa de la capsula vacía

M2: Masa de la capsula con muestra antes del proceso de secado

M3: Masa de la capsula con la muestra desecada

100: Factor matemático de porcentaje

2.7.2 *Determinación de cenizas totales*

Es un método gravimétrico para el cual se procede a pesar 2 gramos del material vegetal triturado, esto se traslada a un crisol de porcelana tarado, esto se coloca en un reverbero para carbonizar la muestra y posteriormente se inserta en un horno mufla a 700°C por el lapso de 2 horas. Cumplido este tiempo se coloca el crisol en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se

procede a pesar; se introduce nuevamente el crisol en la mufla a 700°C por media hora más y se repite este proceso hasta que el peso sea constante (USP 2007) (UNAD 2011).

En el caso de que la muestra presente trazas de carbón se añade gotas de peróxido de hidrogeno, ácido nítrico o una solución de nitrato de amonio 10 mg en 100 mL y se evapora con la finalidad de que el residuo sea casi de color blanco. Este ensayo se realizó por triplicado y los cálculos se realizaron mediante la siguiente formula:

$$\%C1 = \frac{M2-M}{M1-M} \times 100$$

$$\%Ct = \frac{C1}{100-H} \times 100$$

Dónde:

%C1: porcentaje de cenizas en base hidratada

M: masa del crisol vacío

M1: masa del crisol con la muestra antes del proceso de incineración

M2: masa del crisol con la muestra incinerada

%Ct: porcentaje de cenizas totales en base anhidra

H: porcentaje de humedad

100: Factor matemático de porcentaje

2.7.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Es un método gravimétrico en el cual a las cenizas totales se le añade 20 mL de agua destilada, se tapa el crisol de porcelana y se hace hervir de manera delicada por 5 minutos. En papel filtro se hace pasar la solución resultante y se coloca al crisol de porcelana inicial, seguidamente se

carboniza en un reverbero y se incinera en la mufla a 700°C por un lapso de 2 horas (USP 2007) (UNAD 2011).

Una vez que se cumple el tiempo se coloca en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; este proceso se repite en intervalos de 30 minutos hasta peso constante. Este ensayo se realizó por triplicado y los cálculos se realizaron mediante la siguiente formula:

$$\%C1 = \frac{M2-M4}{M1-M} \times 100$$

$$Ca = \frac{C1}{100-H} \times 100$$

Dónde:

%C1: porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

M: masa del crisol vacío

M1: masa del crisol con la muestra antes del proceso de incineración

M2: masa del crisol con la muestra incinerada

M4: masa del crisol con las cenizas insolubles en agua

Ca: cenizas totales solubles en agua en base anhidra

H: porcentaje de humedad

100: Factor matemático de porcentaje

2.7.4 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Es un método gravimétrico en el cual a las cenizas totales se le añade 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapa el crisol de porcelana y se hace hervir delicadamente por 5 minutos. En el papel filtro se filtra la solución resultante y se realiza un lavado con agua destilada caliente hasta que al

acidularle con ácido nítrico; al mismo que se le añade 2 gotas de nitrato de plata 0,1 N no presente muestras de cloruros y se coloca al crisol inicial, seguidamente se carboniza en un reverbero y se incinera en la mufla a 700°C por 2 horas (USP 2007).

Alcanzado el tiempo establecido se coloca en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; este proceso se repite en intervalos de 30 minutos hasta que el peso sea constante. Este ensayo se realizó por triplicado y los cálculos se realizaron mediante la siguiente formula:

$$\%C1 = \frac{M2-M}{M1-M} \times 100$$

$$\%Ci = \frac{C1}{100-H} \times 100$$

Dónde:

%C1: porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M: masa del crisol vacío

M1: masa del crisol con la muestra antes del proceso de incineración

M2: masa del crisol con la muestra incinerada

Ci: cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra

H: porcentaje de humedad

100: Factor matemático de porcentaje

2.8 Tamizaje fitoquímico

2.8.1 Obtención de los extractos etéreo, etanólico y acuoso

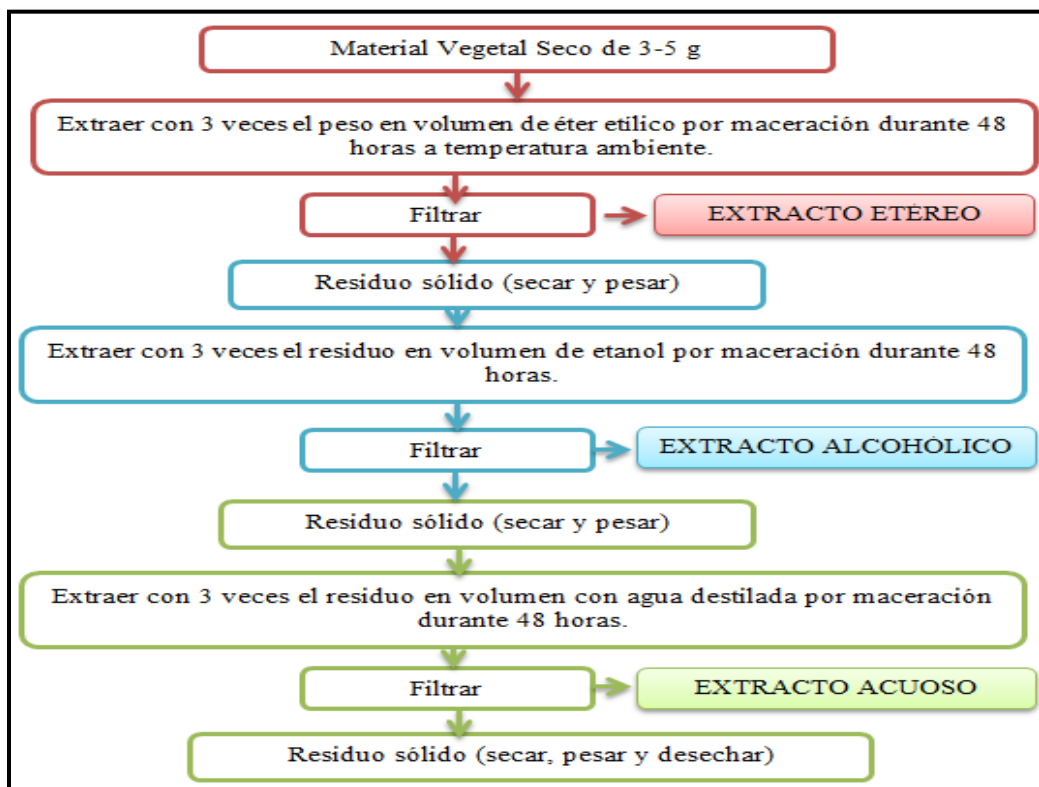


Figura 11-2: Extracción sucesiva de los extractos del material vegetal para realizar el tamizaje fitoquímico.

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.8.2 Ensayos del tamizaje fitoquímicos

Ensayo de Sudan

Permite conocer la presencia de compuestos grasos, en una alícuota de la muestra se colocó 1mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III y se evapora el solvente mediante baño maría. Se considera positivo si hay la presencia de gotas o una película de color rojo en las paredes del tubo de ensayo (Martínez et al. 2006).

Ensayo de Dragendorff

Permite conocer la presencia de alcaloides, para ello se tomó una alícuota del extracto, si este se encuentra disuelto en un solvente orgánico debe evaporarse y al residuo se coloca 1 mL de HCl al 1% en agua, mientras que si el extracto es acuoso se debe colocar 1 gota de HCl concentrado, luego se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se observa:

- Opalescencia (+)
- Turbidez definida (++)
- Precipitado (+++)

Ensayo de Mayer

De igual forma se partió de la solución ácida y se añadió una pequeña cantidad de cloruro de sodio en polvo, se agitó y se filtró. Al filtrado añadimos 2 o 3 gotas del reactivo de Mayer y observar:

- Opalescencia (+)
- Turbidez definida (++)
- Precipitado coposo (+++)

Ensayo de Wagner

Se partió de la solución ácida y se añadió 2 o 3 gotas del reactivo de Wagner y se reportó los resultados de la misma manera que en la reacción anterior. (Martínez et al. 2006)

Ensayo de Baljet

Permite reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, especialmente cumarinas. Si la alícuota de la muestra no es alcohólica, se debe evaporar mediante baño maría todo el solvente, se colocó 1mL de alcohol, en estas condiciones se colocó 1 mL del reactivo de Baljet observando la aparición de un precipitado o coloración rojo (++ y +++).

Ensayo de Borntrager

Permite reconocer la presencia de quinonas, para lo cual se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el solvente y el residuo se redisolvió en cloroformo, en estas condiciones se añadió 1 mL de hidróxido de sodio. Se agitó para mezclar las dos fases y se deja reposar hasta su separación, si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado (++) o rojo (+++) el ensayo se considera positivo (Martínez et al. 2006).

Ensayo de Lieberman-Buchard

Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides ya que ambos poseen un núcleo del androstano, habitualmente insaturado en el anillo B y en la posición 5-6. Se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el solvente y al residuo se le añadió 1 mL de cloroformo. Se colocó un 1 mL de anhídrido acético y se lo agitó bien, luego se añadió 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se observó un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido
- Verde intenso – visible aunque rápido
- Verde oscuro y/o negro – final de la reacción

Catequinas

Con la ayuda de un capilar se colocó una gota del extracto en un papel filtro, sobre la mancha se colocó la solución de carbonato de sodio. Se observó bajo luz UV la aparición de una mancha verde carmelita (Martínez et al. 2006).

Resinas

Se colocó 10 mL de agua destilada en 2 mL de la muestra del extracto, indicando un ensayo positivo la aparición de un precipitado.

Ensayo de Fehling

Permite identificar la presencia de azúcares reductores, se evaporó el solvente y al residuo se añadió 1 o 2 mL de agua. Se colocó 2 mL del reactivo de Fehling se calienta a baño maría durante 5-10 minutos, el ensayo se considera positivo si la solución se tiñe de rojo o se forma un precipitado del mismo color.

Ensayo de la espuma

Permite identificar la presencia de saponinas en el extracto, como pueden ser de tipo esterooidal o triterpénica. La muestra se diluye con 5 veces más su volumen en agua y se agitó por un tiempo de 5-10 minutos, observando así la aparición de espuma persistente por más de 2 minutos.

Ensayo de cloruro férrico

Permite identificar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. En una alícuota se colocó 3 gotas de tricloruro férrico al 5%, observándose:

- Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa, presencia de taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, presencia de taninos del tipo pirogalotánicos.

Ensayo de la ninhidrina

Permite reconocer la presencia de aminoácidos libres o de aminas. Se colocó en una alícuota del extracto alcohólico 1 mL de la solución de ninhidrina al 2% y se calentó a baño maría durante 5-10 minutos. La presencia de una coloración azul violáceo muestra un resultado positivo.

Ensayo de Shidona

Permite identificar la presencia de flavonoides. Se tomó una alícuota del extracto alcohólico y se diluyó con 1 mL de HCl concentrado y un pedazo de cinta de magnesio metálico, se esperó por 5 minutos, y se añadió 1mL de alcohol amílico y se dejó reposar hasta que las fases se separen.

Se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

Ensayo de antocianidinas

Permite identificar la presencia de estructuras de secuencia C6 –C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se tomó 2mL del extracto alcohólico y se calentó por un tiempo de 10 minutos con 1mL de HCl concentrado, se dejó enfriar y se añadió 1 mL de agua y 2mL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó separar las dos fases. Un resultado positivo del ensayo es la aparición de un color rojo en la fase amílica.

Ensayo de mucilagos

Permite identificar la presencia de polisacáridos. Se tomó una alícuota del extracto en agua, se enfrió a una temperatura de 0-5°C dando como resultado positivo la presencia de una consistencia gelatinosa.

Ensayo de principios amargos y astringentes

Se saboreó una gota del extracto acuoso, reconociendo así el sabor de cada uno de estos principios.

2.9 Extracción de los aceites esenciales

La técnica que se utilizó para la extracción de los aceites esenciales fue la destilación por arrastre con vapor.

- El material vegetal recolectado se dejó secar en un ambiente libre de humedad y en condiciones de oscuridad, durante una semana.
- Posteriormente se procede a cortar la planta en pequeños pedazos formando conjuntos de 115 g de cada una de las tres plantas en estudio.
- Se armó el equipo de destilación
- Dentro del matraz se colocó 115 g de planta y se añadió agua destilada hasta las $\frac{3}{4}$ partes de la capacidad del matraz de tal manera que toda la planta quede sumergida.
- La muestra se sometió a calentamiento para poder obtener el destilado

- El destilado se recogió en un vaso de precipitación de 600 mL
- El destilado obtenido se separó en aceite y agua a través de un embudo de separación
- Los aceites esenciales se secaron con sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en frascos de color ámbar para evitar degradaciones de los mismos (Pozo 2006) (Martinez 2003).

El rendimiento de extracción se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de aceite esencial}}{\text{g de material destilado}} \times 100$$

2.10 Control de calidad de los aceites esenciales

2.10.1 Medición de la densidad de los Aceites Esenciales

Para determinar la densidad de los aceites esenciales se realizó mediante el método del picnómetro para lo cual se debe conocer el volumen de la muestra (Pozo 2006).

Para calcular la densidad de los aceites se utiliza la siguiente formula:

$$\rho = \frac{\omega_{pl} - \omega_p}{V_p}$$

Dónde:

ω_p : peso del picnómetro vacío (g)

V_p : Volumen del picnómetro (mL)

ω_{pl} : peso del picnómetro con el aceite dentro (g)

2.10.2 Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales

Para la determinación del índice de refracción de los aceites esenciales se utilizó un refractómetro de mesa Tipo Abbe "Arcano" 0 – 90 % Brix Con Termómetro Digital.

- Se tomó una gota de aceite y se colocó en el prisma inferior
- Ajustamos los prismas y se ajusta también la luz para obtener una lectura clara

- Cuadramos el plano colocando las líneas divisorias en el centro del cruce

En la escala de arriba se lee IR y en la escala de abajo se leen sólidos totales (Pozo 2006).

2.11 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas de los aceites esenciales para la determinación de la composición química

Se analizó:

- Aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*

Procedimiento:

Cada uno de los aceites esenciales se analizaron en un cromatógrafo Agilent Technologies 7693 Autosampler, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5977 y equipado con un puerto de inyección split/splitless (250°C, relación split 1:30) y un inyector automático Agilent 7890. La separación de los componentes de los aceites esenciales se realizaron en una columna capilar de sílice fundida HP-88 de 60 m x 0.50 mm, d.i. x 0.2 µm, df, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (metilsiloxano). El gas de arrastre utilizado fue helio (He, 99.9995%, AGA Fano, S.A.), con flujo constante de 0,7 mL min⁻¹. La programación de temperatura del horno fue 40° C (5 min) a 5° C min⁻¹ hasta 120° C (2 min) a 2° C min⁻¹ hasta 150° C (5 min) y, finalmente, a 5° C min⁻¹ hasta 240° C (5min) (Quintanilla et al. 2012).

Los componentes de los aceites esenciales se identificaron por comparación de sus espectros de masas, obtenidos por GC-MS, e índices de retención (polar y apolar, calculados con base en la serie homóloga de n-alcanos C9-C25, Sigma-Aldrich), con los de bases de datos (D:\MassHunter\Library\NIST14.L) y de patrones certificados, obtenidos bajo idénticas condiciones (Quintanilla et al. 2012).

2.12 Estudio de Genotoxicidad de los aceites esenciales

2.12.1 Ensayo de Micronúcleos

Para determinar la genotoxicidad de los aceites esenciales se realizó el ensayo de micronúcleos para lo cual se utilizó 8 bulbos de *Allium cepa* (cebolla).

Para realizar este ensayo se siguió el siguiente procedimiento:

Parte 1:

- Se quitaron las catáfilas y raicillas secas de cada uno de los bulbos.
- Seguidamente se colocaron en 8 vasos desechables 60 mL de agua destilada
- Se introdujeron los bulbos en los vasos con agua con la finalidad de que el disco germinativo de la cebolla entre en contacto con el agua.
- El cambio del agua del vaso fue diario para evitar contaminación.
- Después de 72 horas se retiraron del agua los bulbos con las nuevas raicillas aproximadamente de 2-3 cm de largo, a fin de asegurar la presencia cinética del ciclo celular.
- Las raíces en crecimiento se trataron durante 48 horas a 22°C con los aceites esenciales a diversas concentraciones (0,2 y 0,4%).
- Como control negativo se usó agua destilada y como control positivo EtOH absoluto igualmente incubados a 22°C por un lapso de 48 horas.
- Terminado el tiempo de exposición al tratamiento se tomó las muestras de la región de células del meristema y F1 por simple corte (primer milímetro detrás de la capa de la raíz) (Ma et al. 1995).

Parte 2:

- Las raíces se colocaron en una solución de Farmer (ácido acético 1: 3 y MeOH absoluto) a 4 ° C durante 24 horas.
- Se hidrolizaron posteriormente en HCl 1 N a 55°C por 8 minutos para romper los enlaces de la pared celular.
- Las muestras se enjuagaron tres veces con agua destilada para eliminar el HCl y se colocaron en EtOH al 70% a 4°C.
- Las raíces se maceraron en ácido acético al 45%.
- Se tiñeron durante 5 minutos con acetato de orceína al 1% de acuerdo a la técnica rápida de Tjio y Levan.
- Los ápices coloreados fueron colocados entre porta y cubre objetos para realizar el “squash” (aplastamiento).
- Las muestras preparadas se observaron con microscopio óptico con el objetivo de 10x y 40x (García-Bores et al. 2017).

Cada experimento fue realizado por triplicado.

Para calcular la genotoxicidad, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Índice mitótico (MI) total = número de células de cada fase $\times 100/1000$

Micronúcleos (MCN) = número de células de interfase con MCN $\times 100/1000$

Tabla 4-2: Diseño experimental según los tratamientos establecidos

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Agua destilada por 48 horas.	EtOH absoluto por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (0,2%) por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon cf. martini</i> (0,2%) por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon cf. nardus</i> (0,2%) por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (0,4%) por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon cf. martini</i> (0,4%) por 48 horas.	Aceite esencial de <i>Cymbopogon cf. nardus</i> (0,4%) por 48 horas.

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.13 Elaboración de perfumes

Para la elaboración de los lotes de perfumes se usó el diseño estadístico 2^k , y la formulación se realizó en base a las notas de olor (Guimera 1868) (Anexo I).

Se utilizó:

Tabla 4-2: Componentes de la formulación de los perfumes

Aceites esenciales de NOTA ALTA	<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon cf. martini</i> y <i>Cymbopogon cf. nardus</i>
Aceite esencial de NOTA MEDIA	Lavanda
Aceite esencial de NOTA BAJA	Canela
Diluyente	Etanol desodorizado sin desnaturalizar al 96% (perfumol)
Fijador de aroma	Galaxolide

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

2.13.1 Proceso de elaboración de los perfumes

- En un balón de aforo de 10 mL se procedió a añadir aceite esencial de canela (nota baja).
- Después se añadió aceite esencial de lavanda (nota media).
- Luego se añadió el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus* según corresponda (nota alta), completando de esta manera el 30% en aroma.
- Se mezclaron los tres aceites esenciales.
- Se procedió a añadir poca cantidad del diluyente y se homogenizó.
- Armonizados los aceites se añadió 2 mL de fijador de aroma y se fusionó.
- Se añadió el resto de diluyente hasta llegar a la línea de aforo del balón de 10 mL.
- Se fusiono la formulación y se procedió a envasar.
- Se dejó madurar cada formulación por el lapso de 2 semanas.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A partir de las metodologías antes mencionadas a continuación se presentarán los resultados y análisis realizados tanto al material vegetal como a los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus* y su discusión en base a datos bibliográficos.

3.1 Control de calidad de la materia prima

Tabla 1-3: Control de calidad de las hojas y tallos de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*.

PARÁMETRO	HOJAS DE <i>Cymbopogon citratus</i>	HOJAS DE <i>Cymbopogon cf. martini</i>	HOJAS DE <i>Cymbopogon cf. nardus</i>
Contenido de humedad (%)	10,41	10,39	11,77
Contenido de cenizas totales (%)	20,80	20,75	21,23
Contenido de cenizas solubles en agua (%)	13,25	12,36	12,26
Contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (%)	7,55	8,39	8,97

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

En base a los resultados que se muestran en la Tabla 1-3, obtenidos a partir de los métodos gravimétricos realizados a las hojas y tallos del material vegetal, se determinó que las plantas cumplen con los parámetros y límites establecidos por la Farmacopea Británica.

En cuanto al porcentaje de humedad que posee cada planta se asume que se realizó un correcto proceso de secado y almacenamiento, evidenciando que a este porcentaje de humedad no se dará ninguna proliferación de microorganismos, ya que la cantidad de agua es muy baja.

Macroscópicamente, las hojas de *Cymbopogon cf. martini* eran más pequeñas en comparación a *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon cf. nardus* por lo que el contenido de humedad se esperó que sea menor en *Cymbopogon cf. martini*, pero los datos reflejan lo contrario ya que la planta contiene 10,39 % de humedad, que relativamente es igual a las otras especies vegetales siendo más parecida a *C. citratus*, y una pequeña diferencia con *C. nardus* la cual se determinó que tiene 11,77% de humedad.

En cuanto a las cantidades de cenizas totales se determina que las plantas tienen poca presencia de sustancias extrañas o impurezas que puedan influir en los resultados, demostrando así que se tuvo un correcto manejo en cuanto a la recolección y lavado de las plantas haciéndolas óptimas para los estudios posteriores.

3.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*.

ENSAYO	METABOLITO	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon cf. martini</i>	<i>Cymbopogon cf. nardus</i>
Sudan	Aceites y grasas	+	+	+
Dragendorff	Alcaloides	+	+	+
Mayer	Alcaloides	+	+	+
Wagner	Alcaloides	-	-	-
Baljet	Lactonas y cumarinas	-	-	-
Borntrager	Quinonas	-	-	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+	-	+
Catequinas	Catequinas	+	+	+

Resinas	Resinas	-	-	-
Fehling	Azucres reductores	-	-	+
Espuma	Saponinas	+	-	-
Cloruro férrico	Fenólicos y/o Taninos	-	-	+
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-	-	-
Shinoda	Flavonoides	-	-	-
Antocianidinas	Flavonoides	-	-	-
Mucilagos	Polisacáridos	+	+	-
Principios amargos	Principios amargos	-	-	-

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

Una vez realizado cada ensayo de tamizaje de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso, se realizó la Tabla 2-3 en la cual se muestra la comparación de los compuestos presentes en cada muestra vegetal.

El ensayo de Sudan permitió determinar los compuestos grasos en los distintos extractos, dando como resultado que los tres vegetales presentan aceites y grasas en su estructura. En cuanto a los alcaloides, se determinó un resultado positivo en las tres plantas, en los ensayos de Dragendorff y Mayer.

La presencia de cumarinas y lactonas, fue negativa en las tres plantas, así se demostró a través del ensayo de Baljet, de igual forma en el ensayo de Borntrager, a través del cual se determina la presencia de Quinonas en las muestras vegetales (Guapi 2014).

Por otro lado a través del ensayo de triterpenos y esteroides, se encontró la presencia positiva en citratus y nardus, los mismos que permiten reconocer que en estas especies vegetales existen

terpenos con núcleo derivado del androstano. En la determinación de catequinas se obtuvo en los tres casos un resultado positivo, en cuanto al ensayo de resinas, los tres vegetales resultaron negativos para esta determinación.

El ensayo de Fehling dio como resultado positivo en el caso de *nardus*, lo cual no se encontró en las otras especies vegetales, indicando así que *nardus* tiene azúcares reductores del tipo disacárido por su capacidad de reducir al ión Cobre, presente en el reactivo de Fehling.

Otro grupo químico que se encuentra solo en una de las tres especies vegetales fue las saponinas presente solo en *citratum*, siendo este positivo para el ensayo de espuma. En cuanto al ensayo de cloruro férrico se obtuvo presencia positiva en *C. nardus*, dando como resultado la presencia de taninos del tipo pirocatecólicos.

En las tres especies vegetales no hubo presencia tanto de aminoácidos libres, y flavonoides, como indican los ensayos de Ninhidrina, Shinoda y Antocianidinas.

En *C. citratus* y *C. martini* se determinó la presencia positiva de mucílagos, por lo tanto estas especies presentan polisacáridos de alto peso molecular, que tienen la capacidad de gelificar un medio acuoso. En cuanto al último ensayo de principios amargos y astringentes no se encontró presencia de compuestos de estas características.

3.3 Extracción de los aceites esenciales

3.3.1 Rendimiento de los aceites esenciales

Tabla 3-3: Rendimiento de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*.

Aceite esencial	RENDIMIENTO
<i>Cymbopogon citratus</i>	1,25 ± 0,066%

<i>Cymbopogon cf. martini</i>	1,06 ± 0,020%
<i>Cymbopogon cf. nardus</i>	1,74 ± 0,086%

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

Dentro de las tres especies la que mayor rendimiento presento fue *C. cf. nardus*, con un total de 1,74% que en comparación con otros estudios resultó ser mayor, así como, lo describe (Quintanilla et al. 2012) indicando un 1,06% de rendimiento para este vegetal, en cuanto a *C. citratus* se obtuvo un rendimiento de 1,25 %, mucho mayor al reportado por (Cimanga et al., 2002), el mismo que encontró un rendimiento de 0.46%.

En el caso de *C. cf. martini*, se obtuvo 1,06 % de rendimiento el cual resultó menor en comparación con los estudios realizados por (Khanuja et al., 2005), el cual determinó 1,2% de rendimiento de este vegetal.

3.4 Control de calidad de los aceites esenciales

3.4.1 Medición de la densidad de los aceites esenciales

Tabla 4-3: Densidad de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*.

ACEITE ESENCIAL	DENSIDAD (22°C)
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,8949
<i>Cymbopogon cf. martini</i>	0,8916
<i>Cymbopogon cf. nardus</i>	0,8744

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

Como se observa en la Tabla 4-3, los valores de la densidad de los tres aceites fueron menores a la densidad del agua, lo que permitió un buen desempeño al momento de realizar la técnica de

extracción por arrastre de vapor, por medio de este fenómeno y la diferencia de polaridad, el agua y el aceite se lograron separar correctamente.

Los datos de la densidad de los aceites reportados se encuentran dentro del rango establecido por el Food Chemical Codex, estableciendo como referencia valores entre 0,8750 – 0.8950 (Academy 1996).

3.4.2 Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales

Tabla 5-3: Índice de refracción de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon* cf. *martini* y *Cymbopogon* cf. *nardus*.

ACEITE ESENCIAL	ÍNDICE DE REFRACCIÓN
<i>Cymbopogon citratus</i>	1,4800
<i>Cymbopogon</i> cf. <i>martini</i>	1,4853
<i>Cymbopogon</i> cf. <i>nardus</i>	1,4840

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

El índice de refracción de los tres vegetales es semejante, variando los dos últimos dígitos, pero los tres valores están dentro de los rangos establecidos por <831> (USP 2007) estableciendo como referencia los valores entre 1,4800 – 1,5000.

3.5 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas de los aceites esenciales para la determinación de la composición química

Tabla 6-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*.

Nº	RT	% CR	IDENTIFICACIÓN
1	21.341	0.38	6-Metil-5-hepten-2-ona
2	24.501	7.70	Citronelal

3	25.280	1.14	Cariofileno
4	26.053	0.72	Isoneral
5	26.489	0.56	3,6-Octadienal, 3,7-dimetil (Isogeranial)
6	28.168	0.36	2 - ((3,3-Dimetiloxiran-2-il) metil) -3-metilfurano
7	30.362	1.72	Acetato de geranilo
8	30.664	2.02	Citronelol
9	32.759	21.73	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z) (β -citral)
10	33.557	18.91	Geraniol
11	34.431	43.13	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E) (α -citral)
12	43.351	0.46	Óxido de cariofileno
13	13.403	9.64	β -mirceno

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

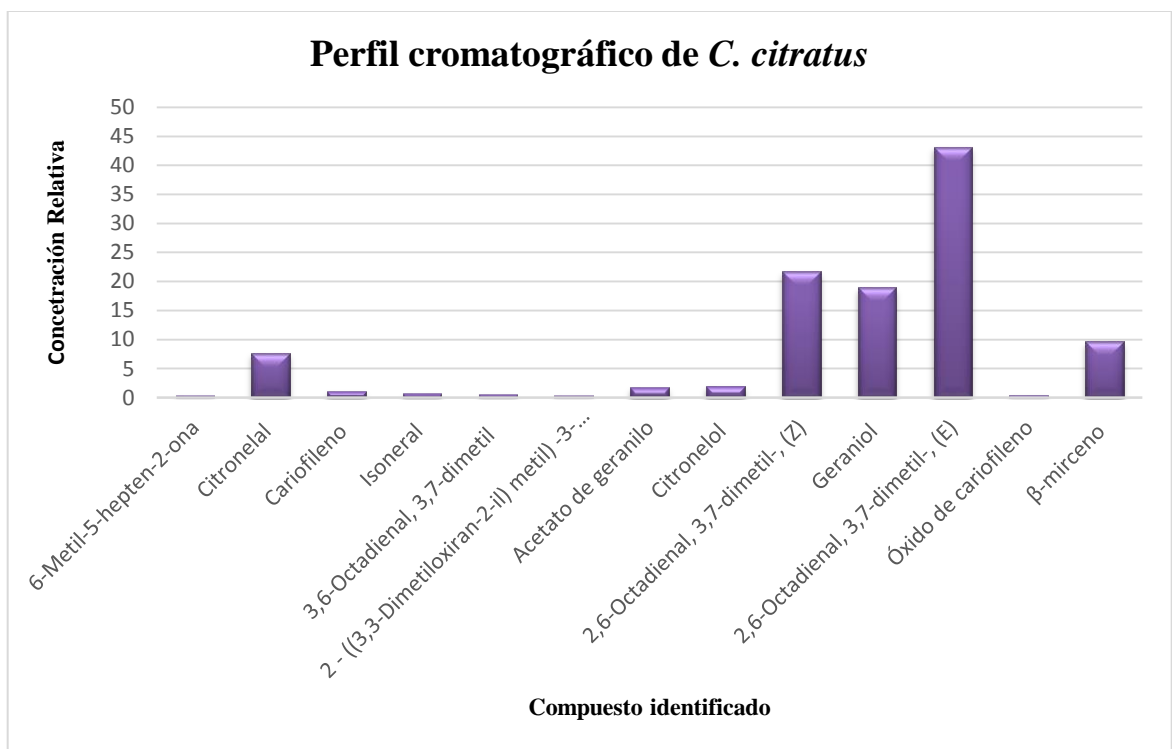


Gráfico 1-3: Perfil cromatográfico de *C. citratus*.

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

El perfil cromatográfico del aceite esencial de *C. citratus*, se ve reflejado en la Tabla 6-3, lográndose identificar 13 compuestos diferentes, como se aprecia en el gráfico 1-3 el compuesto más concentrado fue α -citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil- E), con un porcentaje de 43,13%, seguido por β -citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil – Z), con un porcentaje de 21,73%, y Geraniol con 18,91%.

Dentro de los compuestos minoritarios están 6-Metil-5-hepten-2-ona con 0,38%, 2 - ((3,3-Dimetiloxiran-2-il) metil) -3-metilfurano con 0,36% y Óxido de cariofileno con 0,46%.

Los resultados obtenidos tienen relación a los estudios de (Alzate 2008), coincidiendo que el compuesto mayoritario del aceite esencial de este vegetal es Citral, pero el estudio de Alzate *et al* 2008, propone que el segundo compuesto mayoritario es timol, sin embargo en este trabajo, no se identificó dicho compuesto, esto puede deberse a las condiciones de cultivo de la planta.

Tabla 7-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de *Cymbopogon cf. martini*.

N°	RT	% CR	IDENTIFICACIÓN
1	13.387	10.10	β -mirceno
2	21.288	0.70	6-Metil-5-hepten-2-ona
3	24.274	0.86	Linalool
4	26.465	1.20	Isoneral
5	26.478	1.11	3,6-Octadienal, 3,7-dimetil (Isogeranial)
6	27.905	0.34	2-Undecanona
7	30.391	0.44	Acetato de geranilo
8	32.782	37.89	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z)
9	34.473	45.70	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E)

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

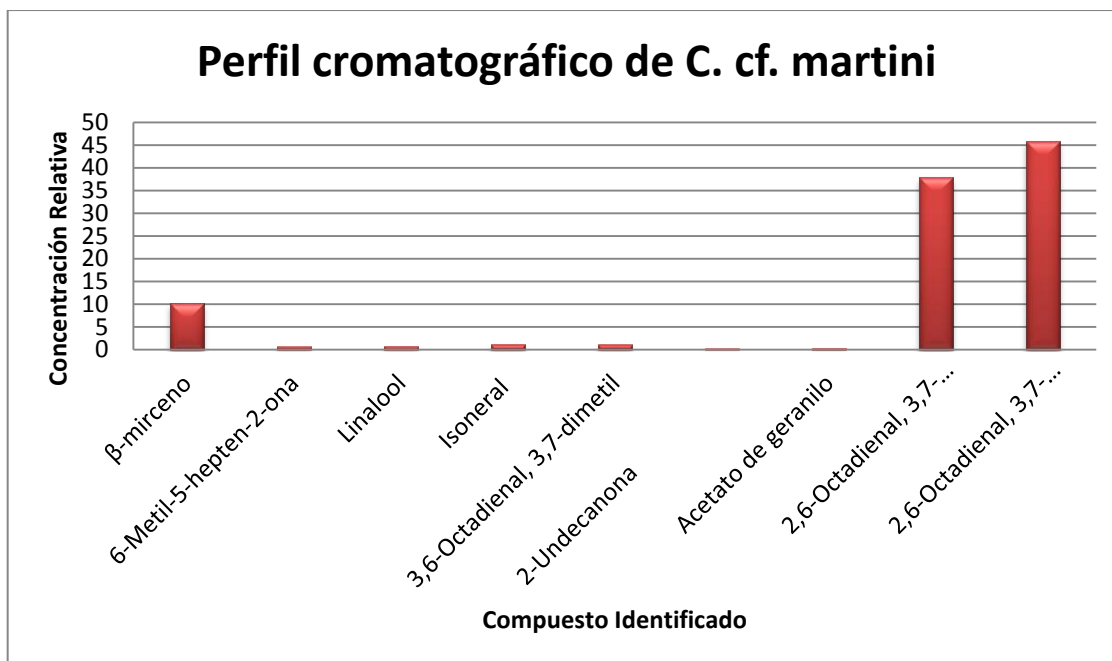


Gráfico 2-3: Perfil cromatográfico de *C. cf. martini*.

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

La Tabla 7-3 muestra los resultados del perfil cromatográfico de *C. cf. martini*, obteniéndose nueve compuestos identificados, dentro de los cuales α-citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil- E) fue el compuesto mayoritario con 45,7 % seguido de β-citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil – Z), con un porcentaje de 37,89 % y β-mirceno con 10,10 %.

En cuanto a los compuestos menos concentrados están 6-Metil-5-hepten-2-ona con 0,7 %, seguido de Acetato de geranilo con 0,44% y 2-Undecanona con 0,34%.

Los estudios realizados por (Quintanilla et al. 2012), reflejan al compuesto mayoritario que fue geraniol, pero el que destaca en este estudio fue α-citral. En el caso de acetato de geranilo Quintanilla *et al* reporta un 15,6%, mientras que en este trabajo refleja 0,44% de este compuesto.

Las variaciones en la composición y porcentaje de presencia pueden ser debidos a las condiciones climáticas en las cuales los vegetales se han desarrollado, puesto que Quintanilla *et al* llevo a cabo su trabajo en Santander, Colombia, sitio en el cual las condiciones meteorológicas son diferentes a la parroquia San Jorge, Ecuador en donde las especies para este estudio fueron colectadas.

La ciudad de Santander se encuentra a 1230 m.s.n.m comparado a San Jorge que se encuentra a 600 m.s.n.m, es decir 2 veces menos de altitud, provocando cambios en la humedad, temperatura y composición química del suelo.

Tabla 8-3: Perfil cromatográfico determinado por GC-MS del aceite esencial de *Cymbopogon* cf. *nardus*.

N°	RT	% CR	IDENTIFICACIÓN
1	13.399	14.18	β -mirceno
2	5.632	0.40	trans- β -Ocimeno
3	21.325	0.32	6-Metil-5-hepten-2-ona
4	24.262	0.88	Linalool
5	26.458	1.70	Isoneral
6	26.458	1.70	3,6-Octadienal, 3,7-dimetil (Isogeranial)
7	27.877	0.67	2-Undecanona
8	32.757	36.19	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z)
9	34.448	44.55	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E)

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

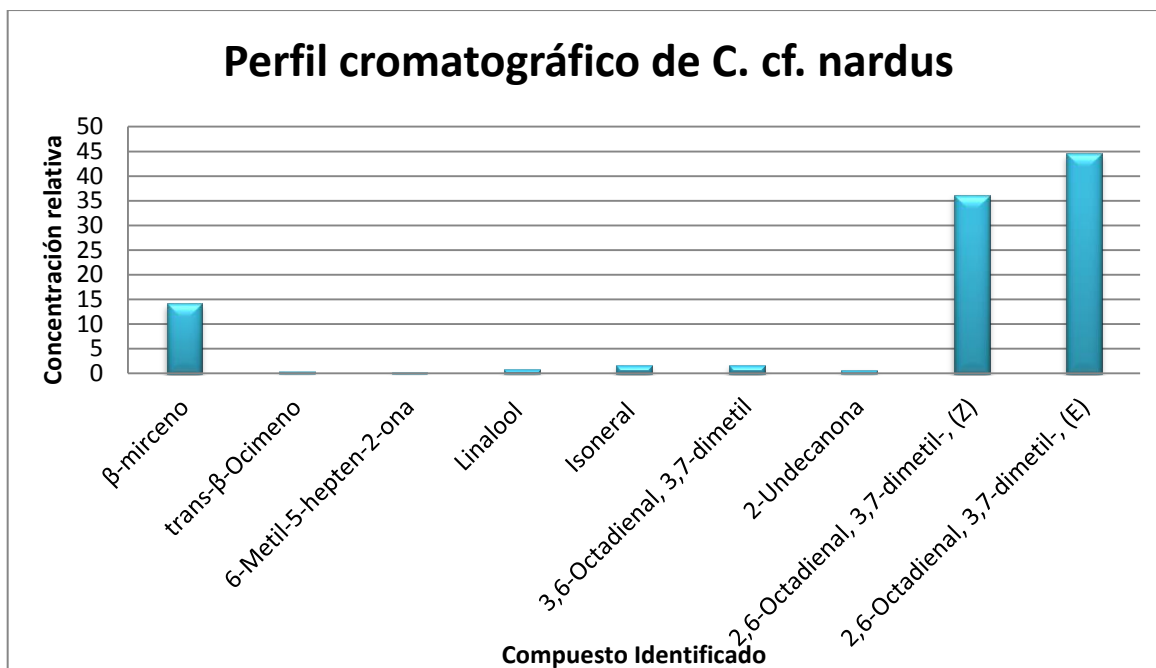


Gráfico 3-3: Perfil cromatográfico de *C. cf. nardus*.

Realizado por: (VILLACRÉS, Yesenia, 2018)

La Tabla 8-3 muestra los resultados del perfil cromatográfico de *C. cf. martini*, obteniéndose nueve compuestos identificados, dentro de los cuales α-citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil- E) fue el compuesto mayoritario con 44,55 % seguido de β-citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil – Z), con un porcentaje de 36,19 % y β-mirceno con 14,18 %.

En cuanto a los compuestos menos concentrados están 2-Undecanona con 0,67 %, seguido de trans-β-Ocimeno con 0,4% y 6-Metil-5-hepten-2-ona con 0,32%.

Como describe (Quintanilla et al. 2012), el compuesto mayoritario fue citronelal con 45,7%, y geraniol con 20,4%, comparando con los resultados de este estudio se deduce que al igual que el caso anterior, la variación es debida a la zona de recolección del material vegetal.

Tabla 9-3: Comparación de los compuestos identificados en los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*.

Nº	COMPONENTE	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Cymbopogon cf. martini</i>	<i>Cymbopogon cf. nardus</i> .
1	6-Metil-5-hepten-2-ona	+	+	+
2	Citronelal	+	-	-
3	Cariofileno	+	-	-
4	Isoneral	+	+	+
5	3,6-Octadienal, 3,7-dimetil (Isogeranial)	+	+	+
6	2 - ((3,3-Dimetiloxiran-2-il) metil) - 3-metilfurano	+	-	-
7	Acetato de geranilo	+	+	-
8	Citronelol	+	-	-
9	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z)	+	+	+
10	Geraniol	+	-	-
11	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E)	+	+	+
12	Óxido de cariofileno	+	-	-
13	β -mirceno	+	+	+
14	trans- β -Ocimeno	-	-	+
15	Linalool	-	+	+
16	2-Undecanona	-	+	+

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

En la Tabla 9-3 se compara los componentes presentes en los aceites, tanto como similitudes y diferencias en cada vegetal.

Los tres aceites se caracterizan por tener 6-Metil-5-hepten-2-ona; Isoneral; Isogeranial; β -citral; α -citral; β -mirceno como similares en su composición química.

En cuanto a *C. citratus*, en su composición química tiene Citronelal; Cariofileno; 2 - ((3,3-Dimetiloxiran-2-il) metil) -3-metilfurano; Citronelol; Geraniol; Óxido de cariofileno, los cuales no se presentan en los otros aceites esenciales restantes.

Acetato de geranilo, está presente solo en *C. citratus* y *C. cf. martini*, en cuanto a Linalool y 2-Undecanona solo se encuentran en *C. cf. martini* y *C. cf. nardus*, y trans- β -Ocimeno se encuentra únicamente en *C. cf. nardus*.

Por las diferencias encontradas en la composición química de los tres aceites esenciales se presume que los vegetales estudiados son especies diferentes, por la presencia de diferentes compuestos que cada especie vegetal muestra en comparación a las demás.

Como (Quintanilla et al. 2012), concluye en su trabajo, sus resultados no son semejantes a los resultados obtenidos en estudios anteriores, en relación a la cantidad y presencia mayoritaria de los compuestos en los aceites esenciales, esto depende como ya se ha mencionado de las condiciones climáticas en las que los vegetales han sido cultivados, así otros estudios como (Khanuja et al., 2005), en sus resultados obtiene diferentes compuestos identificados en comparación a los de este estudio o a los de Quintanilla et al.

3.6 Estudio de Genotoxicidad de los aceites esenciales

3.6.1 Ensayo de Micronúcleos

Mediante los tratamientos expuestos en la Tabla 4-2, se pudo obtener los datos del porcentaje de formación de micronúcleos en las raíces tratadas de *Allium cepa*, obteniéndose la siguiente tabla:

Tabla 10-3: Porcentajes de los índices de división celular e índice de micronúcleos.

Tratamiento Parámetro	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Índice- Interfase	29.01	3.54	18.98	18.93	19.18	8.33	9.1	12.15
Índice- Profase	17.68	0.56	3.79	0	0	0	0	3.73
Índice – Metafase	19.19	1.05	0	0	0	0	0	0

Índice- Anafase	17.87	0	0.633	0	0	0	0	0
Índice – Telofase	16.25	0	0	0	0	0	0	0
Índice Mitótico	21.08	0.59	15.8	13.2	10.8	8.4	10	10.7
Índice Micronúcleos	0	1.58	0	0	0	0	0	0

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

Como se aprecia en la Tabla anterior se logró obtener los valores de los diferentes índices de división celular, después de contar 2000 células de cada una de los tratamientos realizados.

Encontrándose la formación de micronúcleos en el control positivo dando como resultado un 1,58% formado del total de células en interfase contabilizadas.

Como se observa (Anexo I) se evidenció el daño en la estructura celular, dando como resultado el efecto clastogénico, el cual se caracteriza por la separación o ruptura del núcleo celular, indicativo de la presencia de daño genético, ya que algunos de estos son movidos, o suprimidos del genoma de la célula.

Otra anomalía observable es la formación de células binucleadas (Anexo I), y un aumento en el tamaño del núcleo logrando tener una forma pseudolobulada, causada por la acumulación excesiva de la cromatina en la periferia del núcleo logrando que este no se condense de forma regular, llegando a provocar apoptosis en las células.

En la tabla 10-3 en el caso de todos los tratamientos, exceptuando al control positivo, no hubo la formación de micronúcleos, pese a la exposición de los distintos aceites esenciales por un periodo de 48 horas, pero se observa que el índice mitótico en los tratamientos es bajo y mientras la concentración de los aceites aumenta el índice mitótico disminuye.

Siendo los casos de las concentraciones al 0.4% de aceite el índice mitótico se ve más disminuido con valores de 8,4% para *C. citratus*; 10% para *C. nardus*; y 10,7% para *C. martini*, en los tratamientos se observa que los índices específicos de la diferenciación celular se ven opacados por la presencia de los distintos aceites a sus concentraciones de estudio.

En los tratamientos con las soluciones de aceites esenciales es decir desde T3 hasta T8 existe índice de interface, pero los demás índices mitóticos se ven nulos, ya que no se encontró la presencia de células en las distintas fases de división celular, exceptuando en T3 y T8 que se observó una

pequeña cantidad de células en profase siendo 3,79% y 3,73% respectivamente al tratamiento, pero solo en T3 se evidenció células en anafase dando como resultado 0,633% en esta fase de división.

Los resultados muestran que la exposición de los meristemas de las raíces sometidos a los tratamientos con los aceites esenciales, hizo que la división celular se detuviera, logrando que las células en proceso de división no pasen de la interfase, por lo tanto el ingreso del aceite esencial al interior de la célula interactúa con el proceso de división impidiendo que se formen los usos acromáticos indispensables para que la célula continúe con los demás procesos de mitosis (Marcano et al. 2010).

Tabla 11-3: Modelo Lineal General Univariado de los diferentes tratamientos aplicados en el estudio de genotoxicidad.

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: RESUMEN					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	9796,747 ^a	55	178,123	62721,883	,000
Interceptación	4545,320	1	4545,320	1600532,011	,000
TRATAMIENTO	3778,432	7	539,776	190069,955	,000
PARAMETRO	4441,361	6	740,227	260654,183	,000
TRATAMIENTO * PARAMETRO	1576,954	42	37,547	13221,162	,000
Error	,318	112	,003		
Total	14342,386	168			
Total corregido	9797,066	167			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)

Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

Como se observa en la Tabla 11-3 según el análisis mediante el Modelo Lineal General Univariado los resultados obtenidos estadísticamente indican la existencia de una diferencia significativa entre los 8 tratamientos aplicados en el estudio, ya que si hay cambio de tratamiento también hay cambio en el parámetro.

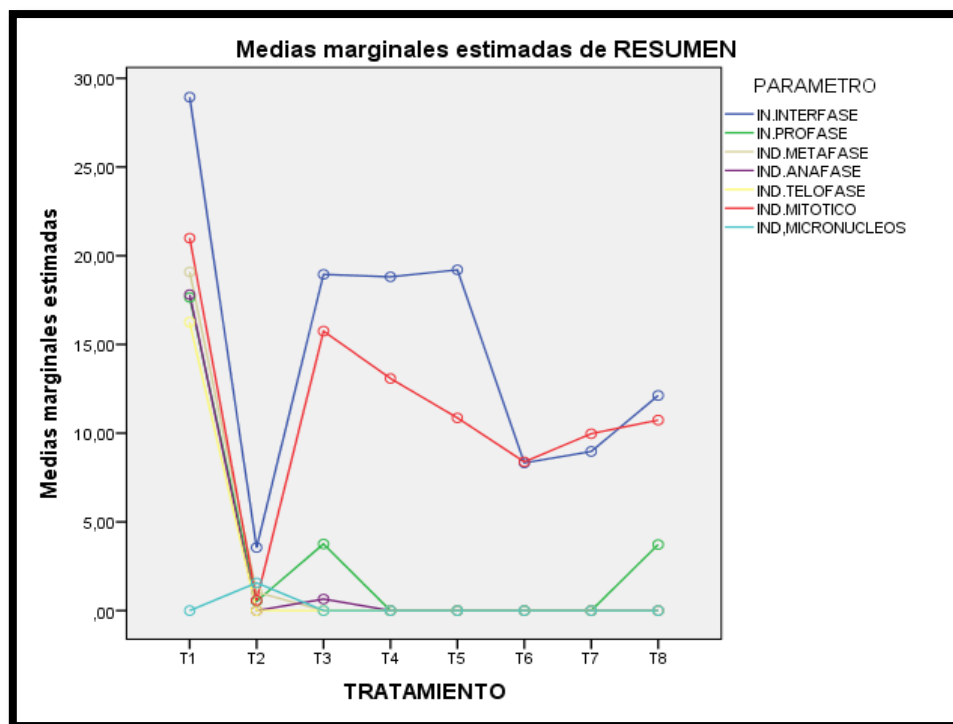


Gráfico 4-3: Efecto de los tratamientos sobre las células en las diferentes fases de mitosis.
Realizado por: VILLACRÉS, Yesenia, 2018

En el gráfico 4-3 se presenta al eje de las “X” a los diferentes tratamientos aplicados en el estudio y al eje de las “Y” con las medias marginales estimadas de los efectos causados por los tratamientos a las células en sus diferentes fases de mitosis, evidenciando que el T3 y T5 son los que presentan más células en estado de interfase, T3 muestra un índice mitótico más elevado que los demás tratamientos por lo tanto se determina que T3 es el que menor cambio causa a nivel de mitosis en las células tratadas.

3.7 Elaboración de perfumes

Evaluada las 7 formulaciones de perfumes a base del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*, a criterio de perfumista se determinó que tanto las formulaciones 2 y 5 son las más destacadas dentro de las 7 fragancias elaboradas ya que en la formulación 2 se utilizó 1,5 mL de aceite esencial de *Cymbopogon cf. martini* más 0,75 mL de esencia de lavanda y 0,75 mL de esencia de canela los mismos que le aportan un aroma delicado y agradable al olfato, mientras que la formulación 5 tiene como componentes 0,75 mL tanto de aceite esencial de *Cymbopogon cf. martini*, *Cymbopogon cf. nardus*, esencia de lavanda y esencia de

canela, aportando de esta manera un aroma más intenso y más perdurable en comparación con las demás formulaciones.

Siendo el aceite esencial de *Cymbopogon cf. martini* componente de estas dos formulaciones y en la misma cantidad tomando en cuenta lo que indica (Guimera 1868) por su agradable aroma dulce, fresco y floral, estas fragancias brindan tranquilidad y equilibrio a la persona que lo usa. Además considerando que el componente mayoritario de este aceite es Citral el mismo que es altamente usado en perfumería por sus características cítricas, incluso se utiliza en metilionona para ocultar el olor a humo (Lewis 2014).

CONCLUSIONES

1. Se determinó el rendimiento de los aceites esenciales de cada una de las plantas en estudio, evidenciando a *C. cf. nardus* con un total de 1,74% como el aceite con mayor rendimiento frente a *Cymbopogon cf. martini* con 1,06% y *Cymbopogon citratus* con 1,25%.
2. Mediante la técnica analítica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, se identificó que los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* son: α -citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil- E), con un porcentaje de 43,13%, seguido por β -citral (2,6-Octadienal, 3,7-dimetil – Z), con un porcentaje de 21,73%, y Geraniol con 18,91%; para *Cymbopogon cf. martini* son: α -citral con 45,7 % seguido de β -citral, con un porcentaje de 37,89 % y β -mirceno con 10,10 % y para *Cymbopogon cf. nardus* son: α -citral con 44,55 % seguido de β -citral con un porcentaje de 36,19 % y β -mirceno con 14,18%.
3. Se determinaron las diferencias en la composición química de los tres aceites en estudio concluyendo que dichos vegetales son diferentes debido a que cada planta presento compuestos diferentes en comparación una con la otra.
4. Tras el estudio de genotoxicidad realizado a través del ensayo de micronúcleos se concluye que la exposición de los meristemas de las raíces de *Allium cepa* sometidos a los diferentes tratamientos con los aceites esenciales no presentan genotoxicidad, pero si evidencian anomalías como daño Clastogénico, células binucleadas y el aumento en el tamaño del núcleo, causadas en las células por exposición a los tratamientos.
5. Se determinó que las mejores formulaciones de perfume en base a los tres aceites esenciales fueron la formulación 2 y 5 por la presencia de Citral en la composición del aceite esencial de *Cymbopogon cf. martini* ya que este componente le brinda ciertas características agradables al perfume.

RECOMENDACIONES

- 1.** Se recomienda que la ESPOCH adquiriera un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masas para facilitar los análisis.
- 2.** Implementar con más respaldos el Herbario de la institución, para mayor confiabilidad de la identificación botánica de las especies vegetales.
- 3.** Es recomendable en el estudio de genotoxicidad realizar más diluciones a mayor concentración de los aceites esenciales para corroborar la inexistencia de micronúcleos.

BIBLIOGRAFÍA

ACADEMIA EUROPEA DE PACIENTES, Estudio de genotoxicidad. , p.3. Available at: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-37432007000200002. 2015.

ACADEMY, N., NAS: Food Chemicals Codex (1996). , 552. Available at: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/004/nas.food.1996.pdf>. 1996.

ALEXIS BERMÚDEZ, MARÍA A. OLIVEIRA-MIRANDA, D.V., La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales : una revisión de sus objetivos y enfoques actuales alexis bermúdez , maría a . Oliveira-miranda. Available at: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005. 2005.

ALZATE, D.A., Evaluación de fitotoxicidad y evaluación de los componentes mayoritarios de *Cymbopogon citratus*. Available at: <http://www.redalyc.org/html/1698/169815393013/>.2008.

BEYRA, a. et al., Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(2), pp.185–204. Available at: <http://rjb.revistas.csic.es/index.php/rjb/article/view/44/44>. 2004.

BOJORQUEZ MORALES, G., Universidad de Colima. *Ucol.Mx*, p.523. Available at: http://www.ucol.mx/interpretextos/pdfs/909_inpret1009.pdf. 2010.

BURBANO, A., Report octubre 2016. , p.2016. Available at: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7804/1/T-UCE-0015-419.pdf>. 2016.

CAMERONI, G., Historia de las hierbas aromáticas especias y aceites esenciales. Available at: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/publicaciones/Hiervas_2012_06Jun.pdf. 2012.

DOM, G.C., El perfume. Available at: <http://caumas.org/wp-content/uploads/2015/03/12-el-perfume1.pdf>. 2012.

FROCHOSO, S.S., Estudio teórico de perfumería. Available at: <http://www.parqueciencias.com/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/educacion-formacion/CienciaAula/esenciasFragancias.pdf>. 2004.

GARCÍA-BORES, A.M. et al., Lippia graveolens photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, pp.72–81. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.014>. 2017.

GIMÉNEZ, D.C. et al., I.E.S. Santo Domingo. Available at: <http://www.parqueciencias.com/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/educacion-formacion/CienciaAula/esenciasFragancias.pdf>. 2011.

GUAPI, J., Caracterización bromatológica y fotoquímica de los granos y hojas del chocho (Lupinus mutabilis Sweet), quinua (Chenopodium quinoa Willd), amaranto (Amaranthus caudatus L.) Y sangor ache (Amaranthus hybridus L.). , p.158. Available at: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/689/1/UNACH-EC-ISC-2014-0004.pdf>. 2014.

GUIMERA, V., Manual del perfumista. Available at: http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1080074670/1080074670_MA.PDF. 1868.

KIRAN GD BABU, V.K., Palmarosa, *Cymbopogon martinii*. Available at: <file:///C:/Users/user/Desktop/PROYECTO DE TESIS/Hierba luisa/Palmarosa, Cymbopogon martinii semillas para comprar.html>. 2004.

LEWIS, S., Palmarosa grass. , pp.4–5. Available at: <https://www.kisansuvidha.com/palmarosa-cultivation/>.2014.

LOACHAMIN SUNTAXI, L.N. & LOAYZA VALAREZO, C.M., Variación de la composición química de los aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y jengibre (*Zingiber officinale*) en función de las condiciones ambientales y del tipo de suelo de la zona de cultivo en las provincias de Loja, Azuay, Caña. , p.74. Available at: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12563/1/UPS-QT10291.pdf>. 2016.

LODHIA, M.H., BHATT, K.R. & THAKER, V.S., Antibacterial activity of essential oils from palmarosa, evening primrose, lavender and tuberose. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(2), pp.134–136. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2839398/>.2009.

LUENGO, P.E.Z., Los aceites esenciales. *Ámbito farmacéutico Fitoterapia*, 23(7), pp.88–91. Available at: http://es.labo-hevea.com/downloads/HE_es.pdf. 2004.

MA, T.H. et al., The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(2), pp.185–195. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116195900101>. 1995.

MARCANO, L., MMTIEL, X. & CAMYO, X., Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.). 2010.

MARTINEZ, A., Aceites esenciales. *Pharmaceutical Chemistry Faculty*, pp.1–34. Available at: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. 2003.

MARTÍNEZ, V. et al., Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana*, 4(2), pp.121–131. Available at: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a04v4n2.pdf>. 2006.

MOCTEZUMA MACIEL, S.F. et al., La Citronella *Cymbopogon Nardus* Funciona Como Perfume Anti- Mosquitos. , pp.1–8. Available at: <http://vinculacion.dgire.unam.mx/Congreso-Trabajos-pagina/PDF/Congreso-Estudantil-2014/Proyectos-2014-Área/1.-Ciencias-Biológicas/biologia/1.8-CIN2014A10213-Biología.pdf>. 2014.

MOLINA, J. LUIS, Universidad Técnica de Manabí. Available at: <http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101519552#.V09WkCyYus4>. 2013.

NATURALISTA, Fotos de Té limón (*Cymbopogon nardus*) · NaturaLista. Available at: [file:///C:/Users/user/Desktop/PROYECTO DE TESIS/Hierba luisa/Fotos de Té limón \(Cymbopogon nardus\) · NaturaLista.html](file:///C:/Users/user/Desktop/PROYECTO%20DE%20TESIS/Hierba%20luisa/Fotos%20de%20Té%20limón%20(Cymbopogon%20nardus)%20·%20NaturaLista.html). 2014.

POZO, X. DEL, *Actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de la hierba luisa Cymbopogon citratus*. Escuela Politecnica del Ejercito. 2006.

QUINTANILLA, G. et al., Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. , 11(1), pp.77–85. Available at: <http://www.blacpma.usach.cl/revista-numero/estudio-comparativo-de-la-composicion-de-los-aceites-esenciales-de-cuatro-especies>. 2012.

ROLDAN, P., Perfumes Cosm ~ Ticos De Imitac16N. Available at:
http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/969/1150_2004_ESIQIE_SUPERIOR_ROLDAN_SOTO_ZUNIGA.pdf?sequence=1. 2004.

RUTA, L., Historia del perfume. Available at:
<https://iescarpetania.files.wordpress.com/2013/04/los-perfumes.pdf>. 1922.

SALDAÑA MEDINA, J.R. & TORRES VINTIMILLA, M.V., Efecto analgésico de aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), ruda (*ruta graveolens*), formulados como conos nasales. , pp.1–72. Available at: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2465>. 2012.

SILVA, G.M., Evaluación del uso de aceite esencial *Cymbopogon Citratus* Stapf (hierba luisa) en la conservación y almacenamiento de tres frutos de consumo masivo del mercado central del cantón Quevedo. Available at: <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/273>. 2016.

SOLANO A &CORREA V, U.T.P.D.L., La Universidad Católica de Loja. *Estudio de las principales fuentes abastecedoras de agua para consumo humano de los principales poblados del cantón Paltas.,* p.286. Available at:
http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/6523/3/Pozo_Esparza_Gladys_Maria.pdf. 2013.

SUSKIND, P., No Title. Available at: <https://leerenalbatros.files.wordpress.com/2009/05/el-perfume.pdf>. 2011.

UNAD, Control de calidad de los helados. , p.5. Available at:
<https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8404/1/Control%20de%20calidad.pdf> 2011.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID., Aceites Esenciales. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales. , pp.66–75. Available at: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>. 1998.

USP, 2007 Usp 30 Nf 25. *Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional*, 2, p.1464. 2007.

ZALACAIN, M., SIERRASESÚMAGA, L. & PATIÑO, A., El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), pp.227–236. Available at: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1137-66272005000300007&script=sci_arttext&tlng=en. 2005.

ZAMBRANO-INTRIAGO, L.F. et al., Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Univ. salud*, 17(1), pp.97–111. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072015000100009. 2015.

ANEXOS

ANEXO A: EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL MATERIAL VEGETAL

(*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*).



ANEXO B: SEPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf.*

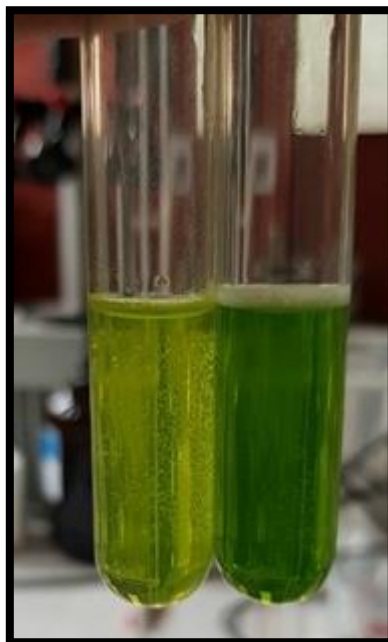
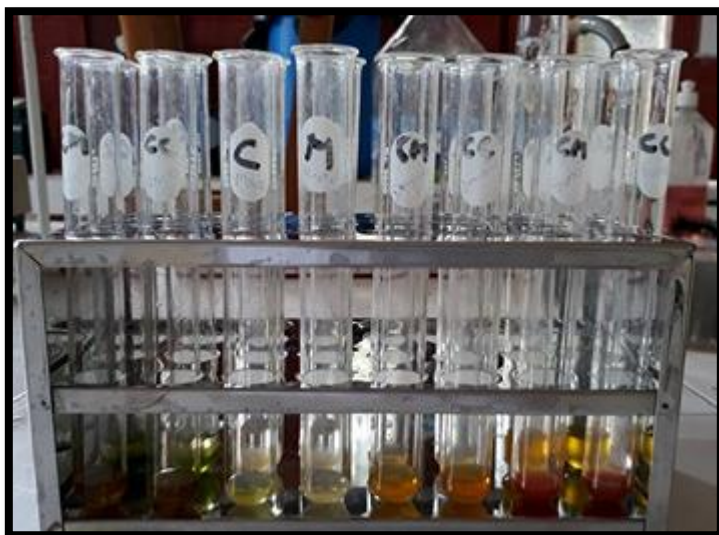
martini y *Cymbopogon cf. nardus*).



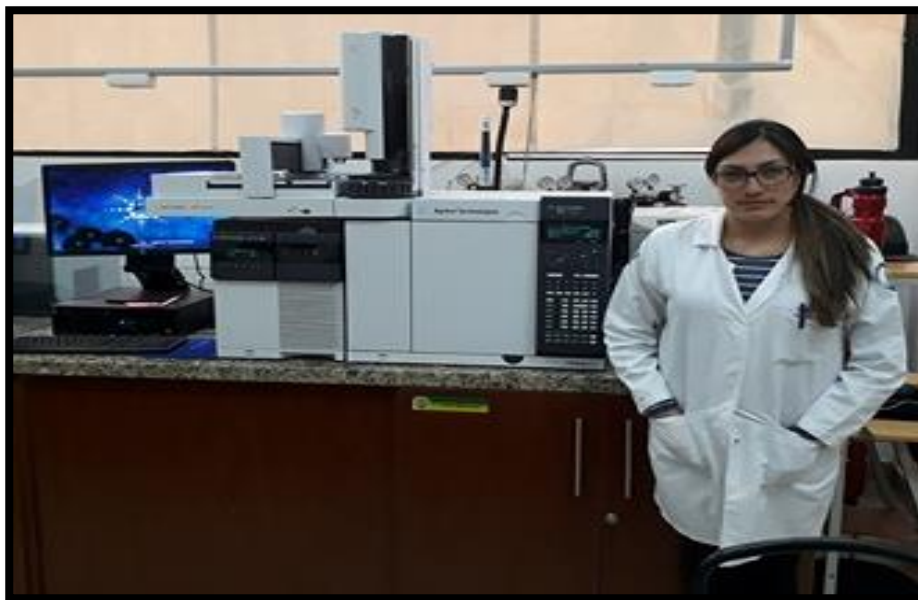
ANEXO C: CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*).



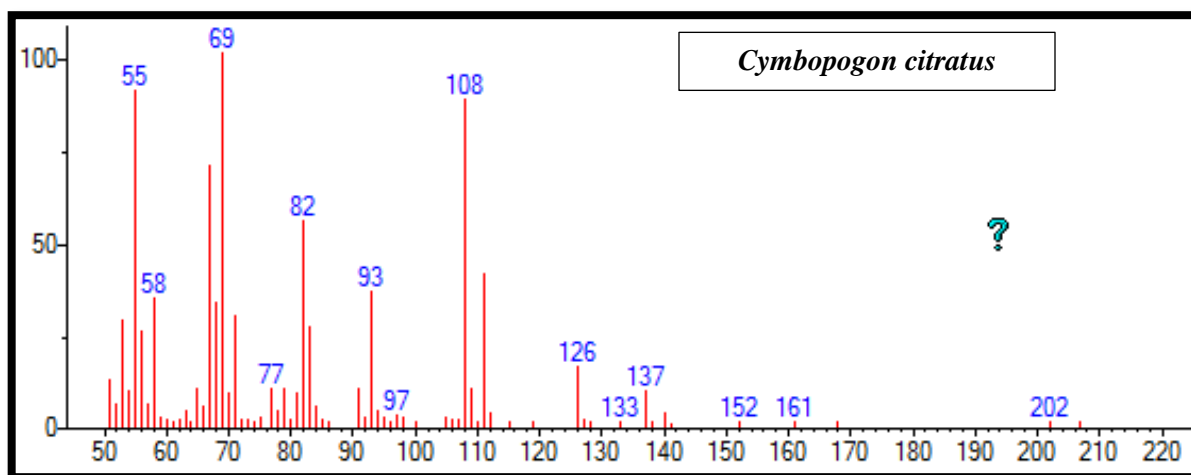
ANEXO D: TAMIZAJE FITOQUÍMICO (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*).

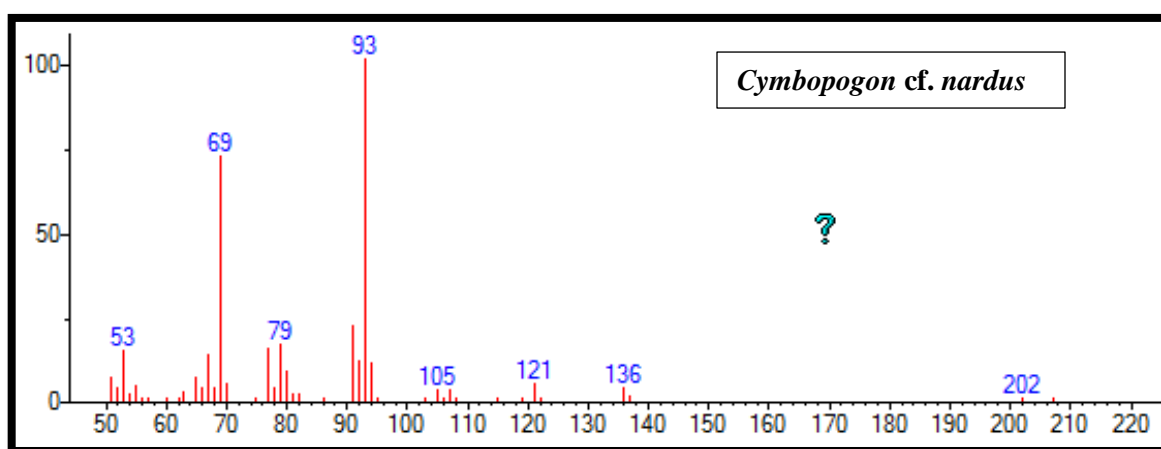
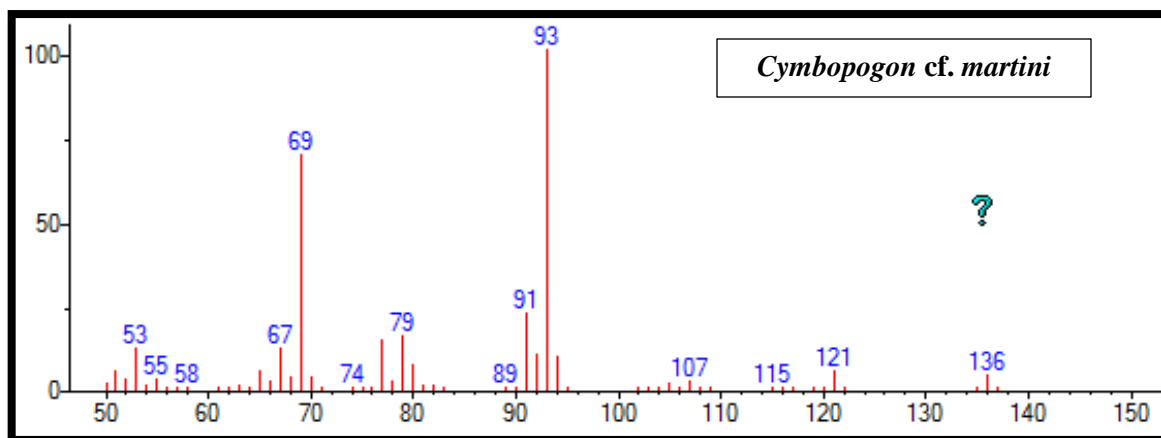


ANEXO E: CROMATÓGRAFO DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

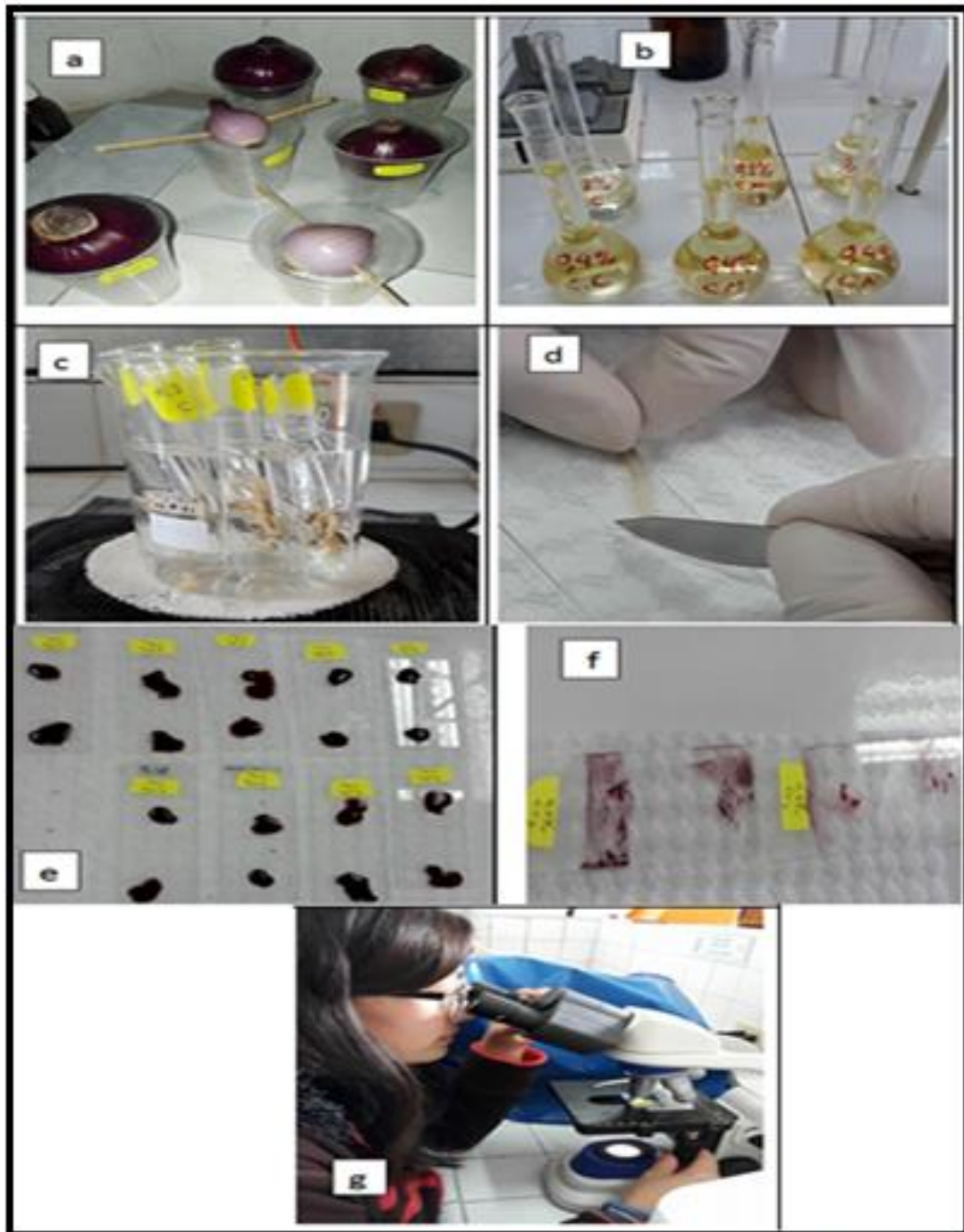


ANEXO F: PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR GC-MS DE LAS TRES MUESTRAS EN ESTUDIO (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*).



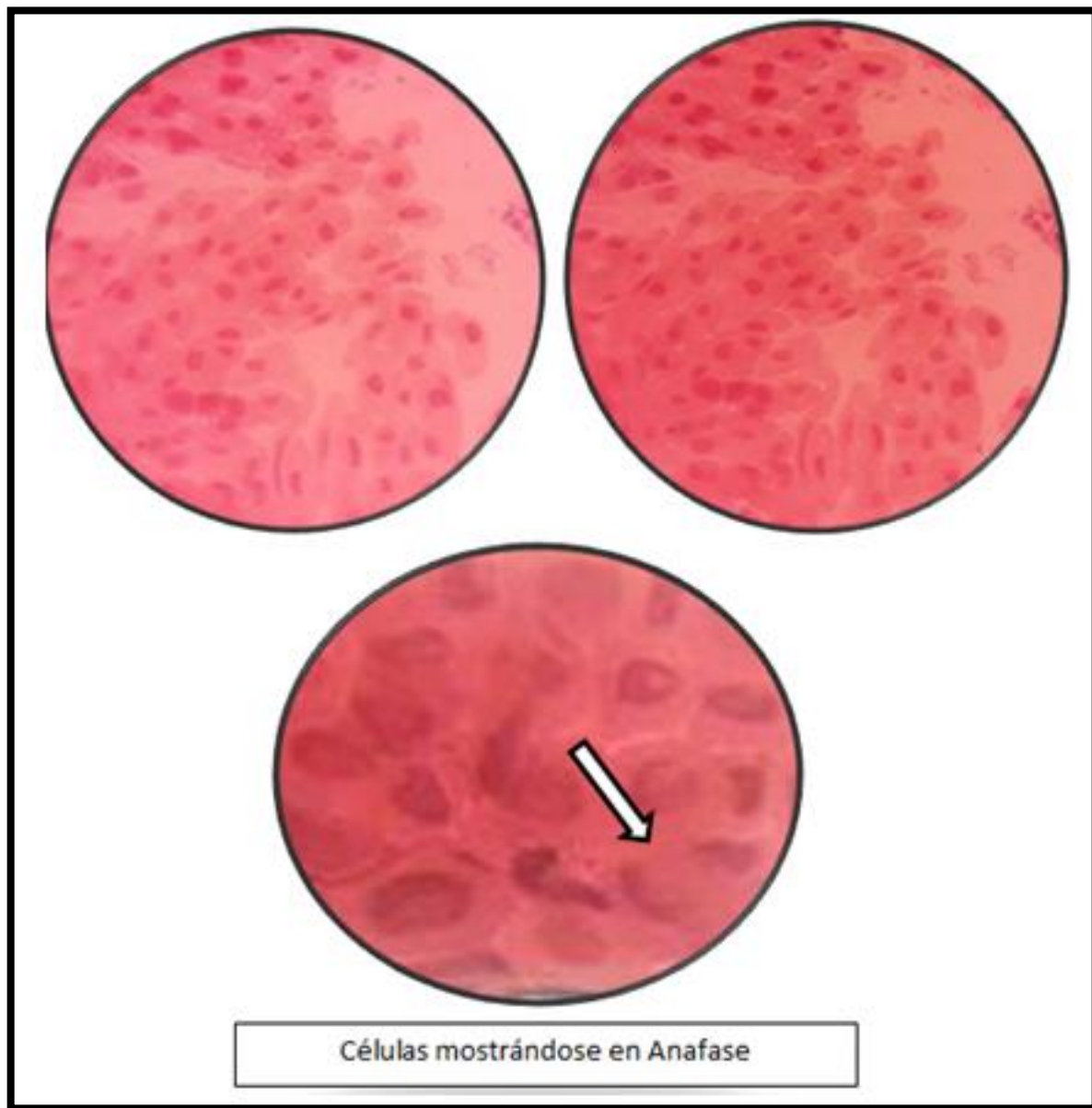


ANEXO G: ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD – ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

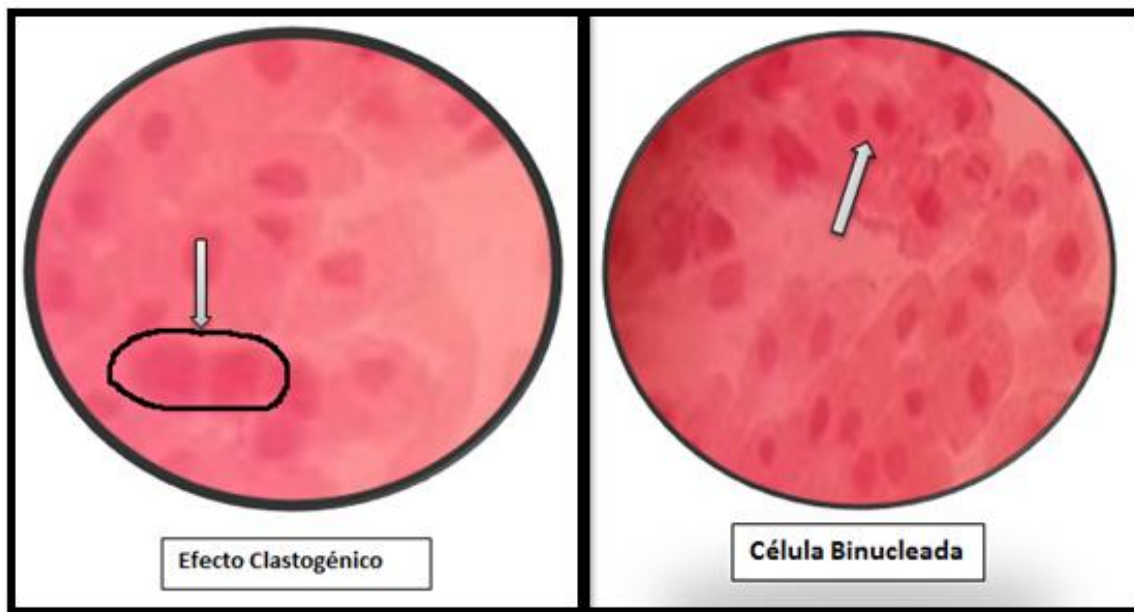


a (acondicionamiento del material biológico), **b** (tratamientos a aplicar a las raicillas), **c** (raicillas en solución de HCl), **d** (corte de las raicillas), **e** (tinción con Orceína acética), **f** (realización del "squash" aplastamiento), **g** (observación al microscopio 10x y 40x)

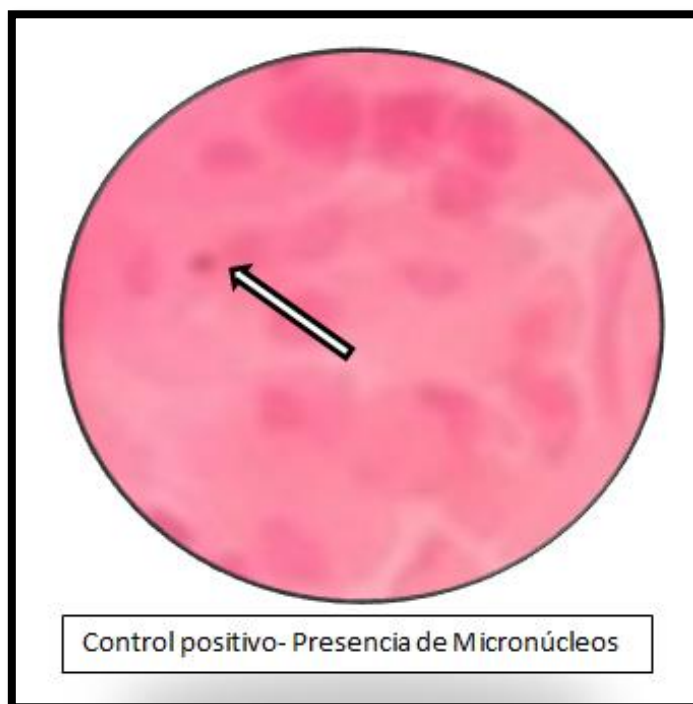
ANEXO H: CÉLULAS DE *Allium cepa* EXPUESTAS A LOS TRATAMIENTOS CON LOS ACEITES ESENCIALES DE *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus* DURANTE 48 HORAS MOSTRANDOSE CON NORMALIDAD SIN PRESENCIA DE MICRONÚCLEOS.



ANEXO I: EFECTOS PRODUCIDOS EN CÉLULAS DE *Allium cepa* POR EXPOSICIÓN A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.



ANEXO J: CONTROL POSITIVO DEL ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD



ANEXO K: DISEÑO ESTADÍSTICO 2^K APLICADO PARA LA ELABORACIÓN DE LOS PERFUMES.

CANTIDAD (%)	COMBINACIONES						
	C	M	N	C - M	M - N	N - C	C - M - N
50	+	+	+	-	-	-	-
25	-	-	-	+	+	+	-
15	-	-	-	-	-	-	+




Realizado por: VILLACRES, Yesenia, 2018

C: *Cymbopogon citratus*
M: *Cymbopogon cf. martini*
N: *Cymbopogon cf. nardus*

ANEXO L: ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE LOS PERFUMES A BASE DE ACEITES ESENCIALES (*Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini* y *Cymbopogon cf. nardus*).



**ANEXO M: AUTORIZACIÓN DEL PERMISO DE INVESTIGACIÓN EMITIDO POR EL
MINISTERIO DE AMBIENTE- PASTAZA- ECUADOR.**

 Ministerio del Ambiente	 DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA	
AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE FLORA		
AC-FLO-DPAP/MAE-2018-002		
<p>El Ministerio del Ambiente, en uso de sus atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a:</p> <ul style="list-style-type: none">• Srta. Yesenia Marisol Villacres Delgado: Investigadora. C.C.060350748-4 <p>Para que lleven a cabo el proyecto de investigación "Estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de tres especies del genero <i>Cymbopogon</i> (<i>C. Martini</i>, <i>C. citratus</i>, <i>C. nardus</i>) aplicado en perfumería en la provincia de Pastaza- Ecuatoriana"</p> <p>De acuerdo a las siguientes especificaciones:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Solicitud de: Srta. Yesenia Marisol Villacres Delgado: Investigadora.C.C. 060350748-42. Institución científica Nacional responsable: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.3. Institución Científica Extranjera: NINGUNA.4. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial Pastaza.<ul style="list-style-type: none">• Directora: Ing. Angélica Navarrete.• Responsable de Vida Silvestre: Lcdo. Víctor Curicama5. Inicio y Fin de la Investigación: La vigencia de este permiso de investigación es de un año calendario desde su fecha de expedición que es desde el 15 de Enero del 2018 hasta el 15 de enero de 2019.6. Entrega del informe final: 03 de enero de 2019.7. Valoración técnica del proyecto: Lcdo. Víctor Curicama, Responsable de Vida Silvestre de la Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza.8. Esta Autorización <u>NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS</u>, sin el correspondiente permiso, competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.9. Estas muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de bioprospección ni ACCESO A RECURSO GENÉTICO, la competencia de Acceso a Recurso genético es exclusiva del MAE, Unidad de Recursos Genéticos.10. De los resultados que se desprenda de la investigación. No podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente. <p>Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo Colecta de muestras botánicas: De cada especie 5kg</p> <p>Obligaciones del investigador</p> <ol style="list-style-type: none">11. Entregar al Ministerio del Ambiente-Direcciones Provinciales correspondientes, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final. Y adjuntar el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras,		
<p>PÁGINA 1 La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para continuar con las actividades de investigación en el país.</p> <div style="text-align: right;"><small>DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA Secretaría: Gerardo Subero y An. Cordero Marín Pastaza - Ecuador Código Postal: 080100 Teléfono: (08) 3- 2884021-2384079 www.ambiente.gov.ec</small></div>		

emitidas por las instituciones científicas ecuatorianas como internacionales depositarias de material biológico).

12. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico.
13. Entregar (2) copias de las publicaciones a la Dirección Nacional de Biodiversidad.
14. Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (se respetará los derechos de autoría).
15. Lista taxonómica de las especies de fauna y flora debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar Formato en la Dirección Provincial que corresponda).
16. Los holotipos y ejemplares únicos sólo pueden llevarse fuera del país en calidad de préstamo por un período de hasta 12 meses. (en caso de requerir más tiempo se deberá realizar la solicitud y entregar informes preliminares).
17. Depositar **Holotipos** y ejemplares únicos en una institución ecuatoriana depositaria de material biológico, Centros de Manejo y Tenencia de Vida Silvestre. Herbarios Nacionales autorizados que cuenten con patente vigente de funcionamiento **Herbario QCA de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito.**
18. Las muestras botánicas/faunísticas a ser depositadas deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 se responsabiliza: Srta. Yesenia Marisol Villacrés Delgado: Investigadora. C.C. 060350748-4

SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS, CANTONES.

Provincia de Pastaza, Cantón Santa Clara, Parroquia San Jorge

SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:

- Comparar la composición Química de los aceites esenciales de las especies *Cymbopogon* (*C. Martini*, *C. citratus*, *C. nardus*)
- Obtener el aceite esencial de las hojas y tallos del material vegetal mediante el método de arrastre de vapor
- Características químicas de los aceites esenciales de *C. Martini*, *C. citratus*, *C. nardus*, mediante cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas.
- Realizar el ensayo de genotoxicidad de los aceites esenciales mediante la prueba de micronúcleos.
- Elaborar 8 formulaciones de perfumes a partir de los aceites esenciales obtenidos

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

MATERIALES EQUIPOS

- | | |
|-----------------------------------|--|
| • Vaso de precipitación de 600 mL | - Estufa Vasos de precipitación de 30 mL |
|-----------------------------------|--|

PÁGINA 2

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para continuar con las actividades de investigación en el país.

- Mufla Pipetas graduadas de 5 mL y 1 mL
- Cromatógrafo de gases
- Matraz Erlenmeyer de 2000 mL
- Espectrómetro de masas Codo tipo U pHmetro
- Refrigerante
- Refractómetro
- Mangueras
- Microscopio
- Soportes universales
- Balanza analítica
- Pinzas para soporte universal
- Desecador Frascos color ámbar de 50 mL
- Refrigerador
- Embudo de separación
- Embudo de filtración
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Sulfato de sodio anhidro
- Orceína
- Etanol 96%
- Éter etílico
- Agua destilada
- Vainillina
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Reverbero
- Crisoles
- Pinzas para crisoles
- Tijeras
- Bisturí
- Mechero
- Vidrio reloj
- Porta y cubre objetos
- Guantes de manejo
- Cofia
- Mascarilla
- Mandil

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

19. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO.
20. ESTA AUTORIZACIÓN FACULTA LA COLECCIÓN/ MANIPULACIÓN DE ESPECIMENES VIVOS, MISMOS QUE **NO PODRÁN** SER UTILIZADOS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL.
21. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO HABILITA EL MANEJO FLORA QUE HAYAN ESTADO EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NÚMERO DE INDIVIDUOS.
22. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
23. PARA EL INGRESO A ÁREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
24. PARA EL INGRESO A ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO RESPONSABLE DE ÁREA.
25. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.
26. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO EN ESTADO ETÍLICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.

27. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
28. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
29. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMÁS NORMATIVA PERTINENTE.
30. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
31. TASA POR AUTORIZACIÓN: VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499 EN EL BANECUADOR B.P. Y REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA CON LA ORDEN DE PAGO NÚMERO 000012841.

Ing. Angélica Mancruz Navarrete Flores
**DIRECTORA PROVINCIAL DEL
AMBIENTE DE PASTAZA**

ANEXO N: IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.0010.CHEP.2018

Riobamba, 07 de marzo del 2018

Ingra Angélica Navarrete.

Directora Provincial de Ambiente de Pastaza

De mis consideracion:

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente Certifico que la señorita Villacres Delgado Yesenia Marisol con CI: 060350748-4, estudiante de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, entregó 3 muestras herborizadas infértiles, las cuales fueron revizadas en la colección y registros de herbario de las cuales las dos primeras muestras corresponden a la especie *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.; y la tercera muestra solo se identificó a nivel de genero es decir: *Cymbopogon* sp. Según autorización de Investigación AC-FLO-DPAP/MAE-2018-002. Las muestras infértiles no serán ingresadas a la colección del herbario y serán archivadas un año y después de esto descartadas para los fines pertinentes.

Agradeciendo la aceptación a la presente.

Me despido

Atentamente



Ing. Jorge Caranqui
BOTÁNICO
HERBARIO ESPOCH